



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



III MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**PROTECÇÃO INDIVIDUAL À PICADA DE MOSQUITOS:
AVALIAÇÃO LABORATORIAL E NO CAMPO DO
EFEITO REPELENTE DE VESTUÁRIO TRATADO COM
INSECTICIDAS OU REPELENTE.**

Leonor Duarte Pinho



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



**PROTECÇÃO INDIVIDUAL À PICADA DE MOSQUITOS:
AVALIAÇÃO LABORATORIAL E NO CAMPO DO
EFEITO REPELENTE DE VESTUÁRIO TRATADO COM
INSECTICIDAS OU REPELENTE.**

Leonor Duarte Pinho

Tese apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Orientadora:

Prof.^a Doutora Carla A. Sousa

Este trabalho foi realizado na Unidade de Ensino e Investigação (UEI) da Unidade de Entomologia Médica (UEM), em cooperação com o Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais (CMDT) e a Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa (UNL), sob Orientação da Professora Doutora Carla Sousa, UEI/UEM, IHMT, UNL. O financiamento foi concedido através do projecto TINAMAR, coordenado pelo Professor Catedrático Virgílio E. do Rosário.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a minha orientadora, Professora Doutora Carla Sousa (Unidade de Entomologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa – UEM/IHMT/UNL), pela sua orientação e ensinamentos científicos, que de certa forma ajudaram-me a expandir os meus conhecimentos na área de Entomologia Médica. Pela constante disponibilidade mesmo em situações de maiores adversidades e, especialmente pelas sugestões construtivas durante a elaboração da dissertação. Acima de tudo por todo o apoio, paciência, amizade e confiança depositada.

Ao Professor Catedrático Virgílio do Rosário, Director da Unidade de Ensino e Investigação, Unidade de Malária/Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais – Laboratório Associado (CMDT-LA), IHMT/UNL e ao Professor Doutor Paulo Almeida, Director da UEI/UEM, por me terem acolhido nas respectivas Unidades durante a realização deste trabalho.

À Professora Catedrática Amélia Grácio, como antiga coordenadora do Mestrado em Ciências Biomédicas, desejo expressar o meu agradecimento por toda a sua disponibilidade prestada.

Ao actual coordenador do Mestrado em Ciências Biomédicas, Professor Doutor Celso Cunha, pela atenção dispensada.

Agradeço aos membros da UEM, à Professora Doutora Odete, ao Doutor Carlos Pires, ao Dr. Ferdinando, por me proporcionaram bons momentos de convívio e aprendizagem. Em especial, ao Engenheiro José Vicente pelo apoio inicial no desenvolvimento do trabalho experimental e pela ajuda na manutenção da colónia de mosquitos sempre que necessitava, e à Doutora Diara Rocha pelo constante suporte da colónia de mosquitos e pela companhia nas horas vagas.

Agradeço também à Professora Doutora Teresa Novo (UEM), Doutora Isabel Calderón (CMDT) e ao Professor Doutor João Pinto (UEM e CMDT) por terem contribuído de forma significativa para a realização deste trabalho.

A todos os meus colegas de mestrado, principalmente à Fábria, à Cristina e ao Bruno pela amizade e pelos momentos partilhados.

O meu especial agradecimento vai para a minha amiga Filipa por todo o apoio, disponibilidade e por estar sempre presente quando necessário.

Aos meus bons amigos Elvis, Pedro, David e Nuno, agradeço os momentos de alegria que me proporcionaram durante esta fase e pela compreensão dos meus deveres académicos.

Em particular, gostaria de agradecer aos meus pais pelo seu constante apoio, pela paciência e pelo encorajamento em todos os aspectos da minha vida.

Finalmente, os meus agradecimentos vão para as minhas amigas de longa data, Joana, Catarina, Patrícia e Raquel, por terem estado sempre presentes nos piores e melhores momentos da minha vida.

Dedico esta tese à minha irmã, por toda ajuda e por aquilo que representa para mim.

ÍNDICE GERAL

<i>AGRADECIMENTOS</i>	<i>i</i>
<i>LISTA DE ABREVIACÕES</i>	<i>vi</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>vii</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>x</i>
<i>RESUMO</i>	<i>xi</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xii</i>
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Âmbito, importância, conceitos básicos em Entomologia Médica.....	1
I.1.1. Métodos de transmissão de doenças.	1
I.1.2. Relação vector-hospedeiro-agente etiológico.....	2
I.2. Introdução aos Artrópodes.....	3
I.3. Insecta (Hexapoda): morfologia, desenvolvimento e classificação adoptada.	4
I.4. Família CULICIDAE: classificação, morfologia, ciclo de vida e principais agentes.	7
I.4.1. Morfologia externa dos mosquitos.	8
I.4.1.1. Ciclo de vida dos mosquitos	10
I.4.1.1.1. Alimentação sanguínea e ciclo gonotrófico.....	11
I.4.1.1.2. Oviposição e biologia dos imaturos.....	12
I.4.1.1.3. Aspectos da biologia e comportamento do adulto.....	14
I.4.1.1.3.1. Acasalamento.....	15
I.4.1.1.3.2. Localização do hospedeiro – características e respostas comportamentais.	15
I.5. Recurso aos repelentes em alternativa dos insecticidas: papel crucial no controlo de Mosquitos (Culicídeos).....	19
I.5.1. Formas de controlo de vectores com importância médica.....	20
I.5.1.1 Controlo biológico	21
I.5.1.2 Controlo genético.....	24
I.5.1.3 Controlo físico (mecânico ou ambiental)	26
I.5.1.4 Controlo químico	27
I.5.2. Principais insecticidas e mecanismos de resistência a estes associados.....	30
I.5.3. Papel dos repelentes no controlo	35
II. OBJECTIVOS	39
III. MATERIAIS E MÉTODOS	41
III.1. Avaliação do efeito de repelência, em condições laboratoriais, de tecidos de algodão tratados com três compostos diferentes: permetrina, DEET e citronela.	41

III.1.1. Material biológico	41
III.1.1.1 Estabelecimento e manutenção da colónia de mosquitos <i>Anopheles stephensi</i> em insectário.	41
III.1.3. Composição dos tecidos impregnados com o insecticida permetrina e com microcápsulas dos repelentes DEET e citronela.	43
III.1.4. Ensaio de repelência em sistema túnel.	43
III.1.5. Ensaio com malha impregnada da <i>Petit Patapon</i> ® para testar o efeito da repelência com a espécie <i>An. stephensi</i>	46
III.1.6. Cálculo dos índices de repelência e de redução da refeição sanguínea. Tratamento estatístico dos resultados.	46
III.2. Avaliação em ensaios de campo do efeito de repelência de tecidos tratados com insecticidas/repelentes seleccionados com base nos resultados laboratoriais.	47
III.2.1. Área de Estudo.	47
III.2.2. Voluntários humanos.	49
III.2.3. Metodologia dos ensaios de campo efectuados	49
III.2.4. Análise e tratamento dos resultados.	51
III.3. Efeito de repelência dos tecidos seleccionados em relação à espécie mais abundante na região da Comporta.	51
IV. RESULTADOS	52
IV.1. Avaliação do efeito de repelência, em condições laboratoriais, de tecidos de algodão tratados com três compostos diferentes: permetrina, DEET e citronela.	52
IV.1.1. Resultados dos ensaios de túnel.	52
IV.1.2. Estimativa da eficácia da repelência dos diferentes tecidos, sem e com diferente número de lavagens, para <i>An. stephensi</i> Liston através do cálculo dos índices de repelência (IRE) e a redução da refeição sanguínea (BFI).	61
IV.1.3. Avaliação do efeito de repelência, em condições laboratoriais, de um tecido de algodão tratado um produto anti-mosquito existente no mercado português.	66
IV.2. Avaliação da repelência no campo com tecidos impregnados de permetrina, na área da Comporta.	67
IV.2.1. Avaliar o efeito da impregnação no número de mosquitos fêmeas que pousaram sobre os tecidos tratados (perneiras com permetrina) e com diferentes números de lavagens.	68
IV.2.1.1. Resultados referentes ao número total de mosquitos colectados e às espécies capturadas.	68
IV.2.1.2. Análise estatística aos resultados das capturas efectuadas sobre tecidos impregnados com perneiras sem lavagens ou sujeitos a diferentes ciclos de lavagens.	70
IV.2.2. Efeito de repelência de uma peça de vestuário impregnada (t-shirt) com diferentes ciclos de lavagens sobre o número de mosquitos que tentam picar os humanos em zonas expostas e não protegidas.	72

IV.2.2.1. Resultados referentes ao número total de mosquitos colectados e às espécies capturadas.....	72
IV.2.2.2. Análise estatística aos resultados das capturas efectuadas sobre tecidos impregnados com t-shirt sem lavagens ou sujeitos a diferentes ciclos de lavagens.	74
IV.2.3. Estudo do efeito da atracção aos mosquitos pelos diferentes voluntários.	76
IV.3. Avaliação do efeito de repelência, em condições laboratoriais dos tecidos seleccionados para o estudo de campo em relação à espécie mais abundante na região da Comporta.	77
V. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	80
VI. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	88
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXOS	97
ANEXO I	98
ANEXO II	101

LISTA DE ABREVIACÕES

Bti	- <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>
DDT	- Diclorodifeniltricloroetano
DEET	- <i>N,N</i> -dietil- <i>meta</i> -toluamida
ELISA	- <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HBI	- <i>Human blood index</i>
HCH	- Hexaclorociclohexano
IGRs	- <i>Insect growth regulators</i>
IRS	- <i>Indoor residual spraying</i>
ITN	- <i>Insecticide-treated nets</i>
<i>kdr</i>	- <i>knock-down resistance</i>
LLIN	- <i>Long-lasting insecticidal nets</i>
LLRTN	- <i>Long-lasting repellent-treated nets</i>
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PCR	- Polymerase chain reaction
SIT	- <i>Sterile insect technique</i>
STRs	- <i>Short tandem repeats</i>
ULV	- <i>Ultra-low-volume</i>
VNTRs	- <i>Variable number tandem repeats</i>
WHO	- <i>World Health Organization</i>
WHOPES	- <i>World Health Organization Pesticide Scheme</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Anatomia geral de um insecto.....	5
Figura I.2. Morfologia básica de um mosquito adulto fêmea. (A) Estrutura externa; (B) armadura bucal: (1) cabeça e apêndices e (2) corte da secção designada de x no probóscis, das estruturas da armadura bucal.	8
Figura I.3 Quadro com as principais diferenças entre mosquitos da subfamília Anophelinae (esquerda) e Culicinae (direita). (A) Diferenças no forma do escutelo em: (1) mosquitos anofelíneos e (2) mosquitos tipicamente culicíneos; (B) Estrutura externa de uma pupa <i>Anopheles</i>	9
Figura I.4. Ciclo de vida de um mosquito fêmea (Diptera: Culicidae).....	11
Figura I.5. Representação esquemática do ciclo gonotrófico de um mosquito fêmea.....	12
Figura I.6. O modo como um hospedeiro influencia a capacidade de um insecto o detectar.....	17
Figura III.1. Localização geográfica da área de estudo.....	48
Figura III.2. Esquema representativo da mudança de posição de cada voluntário, quer com perneiras ou t-shirts.	50
Figura IV.1. Efeito da repelência nos mosquitos fêmeas <i>Anopheles stephensi</i> quando expostas ao tecido impregnado com permetrina em comparação com o seu respectivo controlo. (A) Tecido com zero lavagens; (B) Tecido com 5 lavagens; (C) Tecido com 15 lavagens; (D) Tecido com 25 lavagens; (E) Tecido com 50 lavagens e (F) Tecido com 60 lavagens.	53
Figura IV.2. Efeito da repelência nos mosquitos fêmeas <i>Anopheles stephensi</i> quando expostas ao tecido com DEET microcapsulado (formulação original) em comparação com o seu respectivo controlo. (A) Tecido com zero lavagens; (B) Tecido com 5 lavagens; (C) Tecido com 10 lavagens; (D) Tecido com 15 lavagens e (E) Tecido com 20 lavagens.....	55
Figura IV.3. Efeito da repelência nos mosquitos fêmeas <i>Anopheles stephensi</i> quando expostas ao tecido com DEET microcapsulado n.º 2 (A) e (B), respectivamente e DEET microcapsulado n.º 3 (C), em comparação com o seu controlo correspondente. (A) Tecido com DEET n.º 2 e zero lavagens; (B) Tecido com DEET n.º 2 e 5 lavagens e (C) Tecido com DEET n.º 3 e zero lavagens.	56

Figura IV.4. Efeito da repelência nos mosquitos fêmeas <i>Anopheles stephensi</i> quando expostas ao tecido com citronela micro-encapsulada em comparação com o seu respectivo controlo. (A) Tecido com zero lavagens e (B) Tecido com 5 lavagens.	57
Figura IV.5. Percentagem média de mosquitos fêmeas <i>Anopheles stephensi</i> que tentaram picar e/ou alimentar-se, quando expostas ao tecido impregnado em comparação com o seu respectivo controlo, durante 120 minutos. (A) Tecido com permetrina e sem lavagens; (B) Tecido com permetrina e com 5 lavagens; (C) Tecido com permetrina e com 25 lavagens; (D) Tecido com permetrina e com 50 lavagens; (E) Tecido com DEET e sem lavagens; (F) Tecido com DEET e com 5 lavagens; (G) Tecido com citronela e sem lavagens e (H) Tecido com citronela e com 5 lavagens.....	59
Figura IV.6. Percentagem média de mosquitos fêmeas <i>Anopheles stephensi</i> que efectivamente se alimentaram no hospedeiro, quando expostas aos diferentes tecidos tratados (Permetrina, DEET e citronela) e em relação aos respectivos controlos. (A) Comparação entre os três tecidos tratados a zero lavagens; (B) Comparação entre os três tecidos tratados a 5 lavagens; (C) Comparação entre os diferentes tipos de tecidos tratados com DEET e sem lavagens; (D) Comparação entre o tecido com DEET n.º 2 e tecidos com permetrina a zero lavagens e (E) Comparação entre o tecido tratado com DEET n.º 2 e tecidos com permetrina a 5 lavagens.	61
Figura IV.7. Efeito da repelência nos mosquitos fêmeas <i>Anopheles stephensi</i> quando expostas ao tecido impregnado da marca <i>Petit Patapon</i> ® em comparação com o seu respectivo controlo, sem qualquer lavagem.	66
Figura IV.8. Comparação do produto testado (tecido com permetrina a zero lavagens) com produto análogo no mercado nacional (<i>Petit Patapon</i> ®).	67
Figura IV.9. Percentagem total de fêmeas colectadas que pousaram sobre os tecidos (perneiras, sem e com tratamento).....	68
Figura IV.10. Análise quantitativa dos mosquitos colectados sobre os tecidos (perneiras, com e sem tratamento), na área da Comporta.....	69
Figura IV.11. Resultados das colheitas efectuadas sobre tecidos impregnados (perneiras) e sujeitos a diferentes números de lavagem.	71
Figura IV.12. Percentagem total de fêmeas colectadas que pousaram sobre zonas expostas do corpo não protegidas, na presença de tecidos (t-shirts) sem e com tratamento.	73
Figura IV.13. Análise quantitativa dos mosquitos colectados em zonas expostas do corpo não protegidas, na presença de tecidos (t-shirts com ou sem tratamento), na área da Comporta.....	74

Figura IV.14. Resultados das colheitas efectuadas sobre membros expostos de voluntários que envergavam t-shirt sem (controlo) ou com impregnação com permetrina e sujeitos a diferentes número de lavagens.	75
Figura IV.15. Efeito da repelência nos mosquitos fêmeas <i>Culex theileri</i> quando expostas ao tecido impregnado com permetrina em comparação com o seu respectivo controlo. (A) Tecido com permetrina e sem lavagens e (B) Tecido com permetrina e com 25 lavagens.	78
Figura IV.16. Comparação da repelência do mesmo tipo de tecido (permetrina para as zero e 25 lavagens) com duas espécies de mosquitos diferentes (<i>An. stephensi</i> e <i>Cx. theileri</i>), testadas em condições laboratoriais pelo sistema túnel.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela III.1. Listagem do número total de ensaios para cada tecido por lavagem, com a respectiva cor.	45
Tabela IV.1. Resultados obtidos com permetrina contra mosquitos <i>An. stephensi</i> , para as diferentes lavagens... 63	
Tabela IV.2. Resultados obtidos com DEET contra mosquitos <i>An. stephensi</i> , para as diferentes lavagens.	64
Tabela IV.3. Resultados obtidos com DEET n.º2 e n.º3 contra mosquitos <i>An. stephensi</i> , para as diferentes lavagens.....	65
Tabela IV.4. Resultados obtidos com citronela contra mosquitos <i>An. stephensi</i> , para as diferentes lavagens	65
Tabela IV.5. Resultados obtidos com malha <i>Petit Patapon</i> ® contra mosquitos <i>An. stephensi</i>	67
Tabela IV.6. Estatística descritiva dos resultados das capturas de mosquitos efectuados sobre tecido impregnado (perneiras) consoante o número de lavagens a que estes foram submetidos e para os três dias de ensaio.	71
Tabela IV.7. Comparação dos resultados entre colheitas efectuadas sobre os diferentes tecidos/lavagens e em as datas de captura diferentes.	72
Tabela IV.8. Estatística descritiva dos resultados das capturas de mosquitos efectuados sobre os membros expostos dos voluntários consoante o tipo de t-shirt que envergavam e os diferentes dias de captura.	75
Tabela IV.9. Comparação dos resultados das colheitas efectuadas com t-shirts de diferentes tecidos/lavagens e datas diferentes de captura.	76
Tabela IV.10. Testes estatísticos sobre os resultados das capturas dos mosquitos efectuadas por diferentes voluntários.....	77
Tabela IV.11. Resultados obtidos com permetrina contra mosquitos <i>Cx. theileri</i> , para as diferentes lavagens.....	79

RESUMO

O controlo vectorial representa uma parte importante da estratégia global actual para a prevenção das principais doenças transmitidas por insectos, como a malária, a febre de dengue ou do *West Nile*. Uma das vertentes do controlo vectorial é aquela que se associa à protecção individual dos hospedeiros contra a picada de insectos. É no âmbito desta problemática que surge o estudo aqui apresentado. Este teve como um dos objectivos testar em laboratório a eficácia de três compostos diferentes (permetrina, DEET e citronela) contra a picada de mosquitos *Anopheles stephensi* Liston, 1901, quando aplicados a tecidos de algodão. Com base neste estudo laboratorial, seleccionaram-se os tecidos mais eficientes que foram testados no terreno, na área da Comporta, em ensaios simuladores de uma situação real. Os resultados foram complementados com alguns ensaios preliminares efectuados em laboratório com a espécie *Culex theileri* Teobald, 1903. Nos primeiros ensaios laboratoriais, tecidos impregnados com permetrina mostraram induzir uma repelência mais eficaz do que tecidos com DEET e citronela micro-encapsulados. O efeito de repelência dos tecidos com permetrina manteve-se, mesmo quando estes foram sujeitos a vários ciclos de lavagem. No entanto, os ensaios de repelência/protecção efectuados no campo demonstraram que a eficácia do tecido impregnado com permetrina é afectada pelo número de lavagens. Testes laboratoriais realizados com *Cx. theileri*, a espécie mais abundante da área da Comporta, apontam para que a discrepância observada entre os resultados das experiências laboratoriais e de campo possa estar associada a um comportamento diferencial das espécies envolvidas nos dois tipos de ensaio. Em conclusão, embora o uso de vestuário tratado com microcápsulas de repelentes seja um método promissor na protecção contra as picadas de insectos, este terá de beneficiar de algum investimento futuro para que possa vir a ser considerado uma estratégia válida no controlo vectorial a larga escala. Há que melhorar o modo de incorporação e apresentação do composto activo nos tecidos de modo a obter-se um efeito repelente mais efectivo e prolongado e a procura de repelentes naturais, indutores de menor toxicidade e mais repelência, deve ser continuada.

ABSTRACT

Vector control is an essential component of today's global strategy for the prevention and control of major vector-transmitted diseases transmitted such as malaria, dengue or West Nile fever. One of the main available strategies is the use of individual protection measures against insect bites. In the present study, fabrics treated with three different compounds (permethrin, DEET and citronella) were tested, in laboratory conditions, to determine their efficacy to prevent *Anopheles stephensi* Liston, 1901 bites. Based on these results, cloths impregnated with the most effective compound were tested in field conditions. Field assays were carried-out in Comporta (Portugal). Additional laboratorial studies with the selected fabrics were performed with *Culex theileri* Theobald, 1903 mosquitoes. In the first round of laboratory trials, permethrin-impregnated textiles have shown higher levels of repellency than fabrics with micro-encapsulated DEET or citronella. This repellency effect was maintained even after the textiles had been subjected to several washing cycles. However, the repellency/protection tests conducted in the field have shown that permethrin-impregnated fabric effectiveness is affected by the number of washes. Laboratorial assays performed with *Cx. theileri* indicate that the differences observed in textiles' performance between laboratory and field trials may be due to distinct species-specific behavior of field mosquitoes and *An. stephensi* colony specimens. Although the use of clothing treated with micro-encapsulated repellents is a promising method to prevent mosquito bites, additional investment needs to be undertaken, before being implemented as a valid strategy in large-scale vector control. Improvements will be required in the mode of incorporation and presentation of the active compound on the fabrics in order to obtain a more effective and prolonged repellency effect. In addition, search for new alternative natural repellents, with reduced toxicity and increased repellency, is also desirable.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Âmbito, importância, conceitos básicos em Entomologia Médica

Ao longo dos anos, o ramo de Entomologia Médica tem estudado uma variedade de insectos e outros artrópodes, como carraças ou ácaros, que apresentam relevância em medicina humana. A grande maioria destes artrópodes causam incomodidade devido às suas picadas e parte deles podem actuar como agentes ou promotores de doenças (Ascoli *et al.*, 2009; Fasanella *et al.*, 2010). No entanto, os artrópodes mais importantes medicamente são aqueles que estão envolvidos na transmissão de doenças como a malária, a doença do sono, a febre amarela ou cegueira dos rios, entre outras doenças, que continuam a causar sofrimento e morte nas populações humanas (Service, 1980; Mullen & Durden, 2009). Conhecimentos sobre a biologia, distribuição e comportamento destes artrópodes são assim fundamentais para uma melhor compreensão da epidemiologia e dispersão das doenças que transmitem (Service, 1980). Estes estudos contribuem também para a elaboração de estratégias de controlo dessas doenças que, em certas áreas geográficas, apresentam grande relevância em saúde pública. São exemplos, os estudos genéticos sobre factores como a susceptibilidade dos insecticidas, competência vectorial ou mesmo a preferência do hospedeiro, que podem salientar características importantes dos vectores como um potencial recurso no controlo de doenças nos humanos e animais (Eldridge & Edman, 2004). Outras áreas em desenvolvimento referem-se aos estudos comportamentais que incluem como tópico de investigação a utilização de repelentes na protecção contra mosquitos em alternativa aos insecticidas (Pennetier *et al.*, 2007).

I.1.1. Métodos de transmissão de doenças.

Os artrópodes desempenham um papel importante, na saúde humana e animal, como transmissores de microrganismos patogénicos. Os artrópodes que veiculam activamente, pelos próprios meios, parasitas ou outros agentes patogénicos, de um hospedeiro para outro, são designados de vectores. Alguns artrópodes são vectores de forma accidental com métodos simples e

relativamente ineficientes na transmissão de doenças. No entanto, a forma mais comum de transmissão ocorre quando um insecto infectado ou outro artrópode pica ou alimenta-se no homem ou noutro hospedeiro vertebrado (Service, 1980; Eldridge & Edman, 2004). Assim, a transmissão destes patogénios pode ser do tipo mecânica, no primeiro caso, ou biológica no segundo (Mullen & Durden, 2009). A mais importante forma de transmissão é a biológica. Tal como o nome indica, o agente infectante sofre multiplicação e/ou alguma forma de desenvolvimento no artrópode transmissor, a fim de completar o seu ciclo de vida (Gubler, 2009). Este tipo de transmissão, também designada de cíclica (Service, 1980), ocorre nos casos, por exemplo, da malária, tripanossomose africana, doença de Chagas, leishmaniose e filariose linfática.

Na transmissão mecânica, os agentes etiológicos são transmitidos pela armadura bucal ou outros apêndices contaminados do artrópode transmissor, que permite a sobrevivência do patogénio, mas não o seu desenvolvimento biológico ou multiplicação enquanto por ele veiculado. O vector serve meramente para facilitar a transferência de um hospedeiro para outro hospedeiro, podendo esta ser directa (entre dois hospedeiros) ou indirecta (através de substratos contaminados por produtos secretórios e/ou excretórios). Microrganismos com uma transmissão directa fecal-oral, como enterovirose, bactérias e protozoários são exemplos transmitidos por esta via (McHugh, 1994; Foil & Gorham, 2000; Gubler, 2009).

I.1.2. Relação vector-hospedeiro-agente etiológico.

A transmissão biológica é de longe o mecanismo mais comum e eficiente para a manutenção e transmissão de um agente patogénico disseminado por um vector (Mullen & Durden, 2009).

A propagação biológica de patogénios pelos artrópodes é um processo complexo devido a interacções entre o hospedeiro, o agente etiológico e o artrópode vector. O grau de especificidade e de susceptibilidade dos vectores biológicos para os diferentes patogénios varia fortemente. Numa transmissão mecânica a especificidade é quase inexistente (Service, 1980; Mullen & Durden, 2009).

Diferenças significativas na relação hospedeiro-patogénio-vector, entre diferentes grupos de artrópodes hematófagos, determinam a forma de transmissão de patogénicos aos vertebrados. Para além disto, a especificidade hospedeiro-patogénio-vector reflecte um resultado conjunto de diversas interacções ecológicas, fisiológicas e até comportamentais. Estas são particularmente evidentes no caso das doenças parasitárias sugerindo uma evolução recíproca dos três intervenientes ao longo dos tempos (Sorci *et al.*, 1997). Um desequilíbrio no ecossistema que alberga este triângulo biológico pode conduzir tanto a extinção dos vectores, como a introdução de novos hospedeiros ou à cessação da transmissão do patogénio (Balashov, 1984).

Nas últimas décadas, muitos dos estudos têm sido direccionados para o impacto das alterações climáticas nos artrópodes vectores e nas doenças que estes transmitem. Vários estudos têm abordado a questão de como certas alterações ambientais (entre as quais as climáticas) podem afectar e que podem influenciar a distribuição geográfica, a distribuição temporal e/ou a dinâmica de algumas doenças transmitidas por vectores (Sutherst, 2004). São exemplos disso, o aumento de incidência de casos de malária nos últimos anos em determinadas zonas de África (Alonso *et al.*, 2010), a dispersão dos vectores da malária para novas zonas (Tonnang *et al.*, 2010) ou ainda, o aumento de surtos de dengue no mundo (Tabachnick *et al.*, 2009), todas estas situações relacionadas com alterações de temperatura.

I.2. Introdução aos Artrópodes.

O Filo Arthropoda (do grego *arthros*: articulado e *podos*: pés, patas ou apêndices) é o maior grupo do reino animal, representando cerca de 80% de todas as espécies conhecidas. Em particular, mais de 17 000 espécies com interesse em Entomologia Médica são insectos hematófagos e 25 000 ou mais, carraças. O sucesso deste filo deve-se, aparentemente, à variedade de nichos ocupados, desde do fundo oceânico até às altas altitudes; ao seu período de tempo evolucionário com 540 a

600 milhões de anos e à sua elevada biomassa nos diversos ecossistemas (Service, 1980; Lane & Crosskey, 1993; Eldridge & Edman, 2004).

Os artrópodes incluem animais que diferem largamente na sua morfologia mas que partilham alguns caracteres fundamentais os quais, provavelmente, evoluíram de forma convergente. Todos os artrópodes possuem um corpo composto por numerosos segmentos, revestido por uma cutícula resistente, designada de exoesqueleto. Entre as divisões dos vários apêndices e os segmentos do corpo existe uma cutícula flexível, formando as articulações que permitem o movimento. O principal componente da cutícula é a quitina, o segundo polímero mais abundante na terra depois da celulose (Lane & Crosskey, 1993).

Outras características deste filo incluem um corpo segmentado com simetria bilateral e um número variável de apêndices emparelhados (*e.g.* antenas), com funcionalidades diversas que dependem do segmento onde se encontram inseridos. O sistema circulatório é aberto e engloba um coração dorsal e espaços vasculares que constituem o hemocélio; o sistema nervoso consiste num núcleo anterior supra-esofágico (ou cérebro) ligado por um cordão nervoso ganglionar ventral. Os músculos são compostos principalmente por fibras do tipo estriado (Richards & Davies, 1984; Lane & Crosskey, 1993).

A classe Insecta é a maior dentro dos artrópodes com maior importância médico-veterinária. No entanto, outras classes dentro deste filo como a Arachnida (aranhas, escorpiões, carraças, ácaros, etc.), Diplopoda (milípedes), Chilopoda (centípedes) e Pentastomida (*tongue worms*), contêm animais de maior ou menor importância médica (Service, 1980).

I.3. Insecta (Hexapoda): morfologia, desenvolvimento e classificação adoptada.

Os insectos são artrópodes caracterizados por terem o corpo dividido em três regiões, tagmas ou tegmatas (cabeça, tórax e abdómen), resultantes da fusão de segmentos. A cabeça contém um único par de antenas na região frontal acima das peças bucais; normalmente os olhos são

compostos, multifacetados, podendo conter olhos simples e em certos casos serem reduzidos ou vestigiais (**Figura I.1.**). As peças bucais são compostas por um par de mandíbulas e dois pares de maxilas, o segundo dos quais está fundido para formar o *labium*. Estreitamente associados a estes apêndices surgem outras duas estruturas ímpares, o *labrum* ou lábio superior e a hipofaringe. O tórax é formado por três sómitos, cada um com um par de patas, podendo ter um ou dois pares de asas (alguns insectos como as pulgas ou piolhos não possuem asas). O abdómen possui um número variável de sómitos, habitualmente onze, desprovidos de apêndices ambulatorios e terminando com o orifício genital na extremidade posterior do corpo. O desenvolvimento pós-embrionário raramente é directo e a metamorfose faz parte do ciclo de vida da maior parte dos elementos desta classe (Richards & Davies, 1984; Service, 1980; Lane & Crosskey, 1993; Eldridge & Edman, 2004).

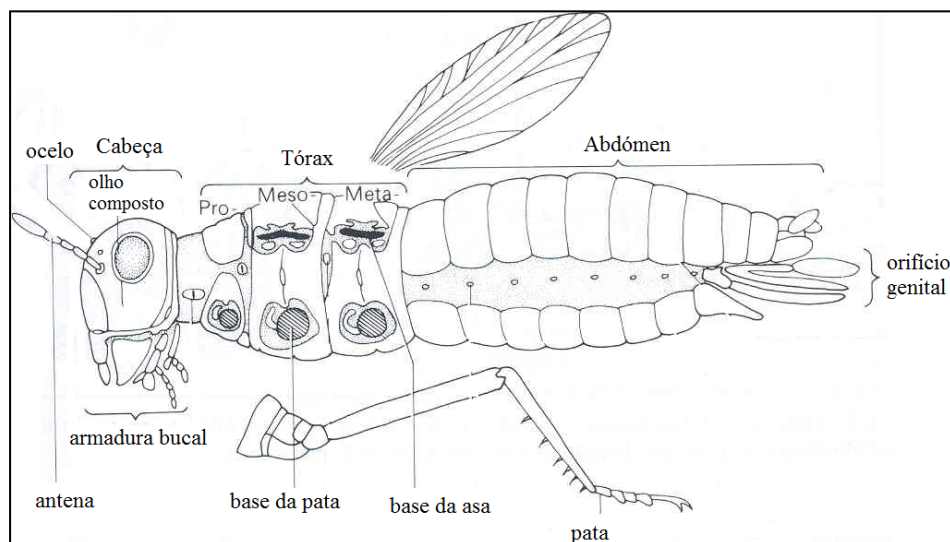


Figura I.1. Anatomia geral de um insecto.

Adaptado de Marquardt, 2010.

A metamorfose é uma característica dominante dos insectos e pode ser incompleta (hemimetabola) ou completa (holometabola). No caso de insectos com metamorfoses incompletas, hemitabólicos, os ovos dão origem a uma forma imatura designada de ninfa. As ninfas são semelhantes aos adultos e as principais alterações que ocorrem durante o seu desenvolvimento são no tamanho, na proporção do corpo, na capacidade reprodutora ou no crescimento das asas. Em regra, quer as ninfas quer os adultos alimentam-se do mesmo tipo de comida. No caso dos insectos

hematófagos, esta característica faz com que todas as fases estejam potencialmente envolvidas na transmissão de agentes patogénicos (*e.g.* triatomídeos e a transmissão da doença de Chagas). No caso dos insectos holometabólicos, os ovos eclodem para uma forma imatura com estrutura e biologia substancialmente diferente da adulta. Esta forma imatura é normalmente designada de larva e habita, em regra, num meio completamente diferente dos adultos. Assim apresenta necessidades nutritivas igualmente distintas, o que evita competição intra-específica de recursos entre os diferentes estados. O desenvolvimento larval culmina com a metamorfose do último estado larvar em pupa. As pupas têm um invólucro rígido, o pupário, e encontram-se numa fase quiescente onde não são requeridas necessidades nutricionais. Esta fase imatura estabelece uma ponte entre as larvas, especializadas na alimentação, e os adultos fundamentalmente ligados à dispersão e à reprodução. São exemplos de insectos holometabólicos com importância médica insectos da ordem Diptera (*e.g.* mosquitos, mosca tsé tsé ou doméstica) e da ordem Siphonaptera (pulgas) (Service, 1980; Lane & Crosskey, 1993; Triplehorn & Johnson, 2005).

Existindo vários sistemas classificativos para os insectos, em parte devido a escassez de registos paleontológicos, neste trabalho adoptou-se aquele apresentado por Richards & Davies (1984). Estes autores dividem a classe Insecta em dois grupos de ordens: o grupo das ordens dos insectos Apterygota e o grupo das ordens dos insectos Pterygota. O primeiro grupo inclui os insectos mais primitivos e ápteros (sem asas) e quase sem metamorfoses aparentes (ametabolas), que geralmente continuam a sofrer mudas mesmo após a maturação sexual. O segundo grupo é constituído por insectos mais evoluídos, que se desenvolvem por metamorfoses, e em que os adultos são alados ou secundariamente ápteros. Estes insectos apresentam metamorfoses incompletas (Exopterygota ou hemimetabola) ou completas (Endopterygota ou homometabola) como foi referido anteriormente (Service, 1980; Lane & Crosskey, 1993).

A ordem Diptera é uma das 9 ordens dos Endopterygota, grupo este considerado com tendo uma origem monofilética. É uma das maiores ordens dos Insecta e os seus insectos-membros são estruturalmente muito especializados. A ordem Diptera divide-se em três subordens: Nematocera,

Brachycera e Cyclorrapha. É na primeira subordem que se incluem os insectos objectos do estudo que aqui se apresenta. A Família CULICIDAE, taxa formado pelo conjunto de dípteros vulgarmente designados de mosquitos, é uma das 7 famílias da Superfamília Culicoidea.

I.4. Família CULICIDAE: classificação, morfologia, ciclo de vida e principais agentes.

Actualmente na família CULICIDAE existem cerca de 3400 espécies de mosquitos distribuídas por mais de 34 géneros. O número de géneros varia segundo os autores e o reconhecimento ou não da elevação de certos subgéneros à categoria de géneros: *e.g.* os géneros *Ochlerotatus* e *Stegomyia* considerados por alguns autores como subgéneros de *Aedes*. A família CULICIDAE divide-se em três subfamílias: Toxorhynchitinae, Anophelinae (anofelíneos) e Culicinae (culicíneos). Os mosquitos possuem uma vasta distribuição mundial, ocorrendo especialmente nas zonas tropicais e temperadas mas estendendo-se até ao círculo ártico, estando apenas ausentes na Antárctica e em algumas ilhas. Podem encontrar-se até 5500 m de altitude e em minas a 1250 m de profundidade abaixo do nível do mar (Service, 2008).

Na subfamília Toxorhynchitinae, ao contrário das outras duas subfamílias os adultos não são hematófagos e as larvas são predadoras de insectos. Assim, embora as espécies desta subfamília não estejam envolvidas na transmissão de patogénios aos humanos, estas têm sido alvo de alguns estudos no âmbito da Entomologia Médica como potenciais agentes de controlo biológico. Os mosquitos mais importantes na transmissão de doenças pertencem aos géneros *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Psorophora*, *Mansonia*, *Haemagogus* e *Sabethes*. Espécies de *Anopheles* para além de transmitirem malária, também são vectores de filarioses (*Wuchereria bancrofti* Cobbold, 1877; *Brugia malayi* Brug, 1927 e *B. timori* Partono *et al.*, 1977) e de algumas arboviroses. Algumas espécies de *Culex* também transmitem *Wuchereria bancrofti* e uma variedade de arboviroses. O género *Aedes* contém vectores importantes da febre amarela, dengue, vírus do *West Nile* e outras arboviroses, sendo certas espécies vectoras de *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi*. Espécies do

género *Mansonia* transmitem *Brugia malayi* e *Wuchereria bancrofti* para além de algumas arboviroses. Mosquitos *Haemagogus* e *Sabethes* são essencialmente reconhecidos como vectores de febre amarela na América do Sul e Central (Service, 2008). Apesar de muitas espécies de mosquitos poderem não estar envolvidas na transmissão de doenças aos humanos podem ainda causar grande incomodidade através das suas picadas e actuar como promotores de doenças (*e.g.* infecções dérmicas secundárias devido a lesões de coceira).

I.4.1. Morfologia externa dos mosquitos.

Como a maior parte dos outros membros da ordem Diptera, os mosquitos possuem apenas um par de asas funcionais com o segundo par transformado em hálteres. Os mosquitos são insectos geralmente delgados e de pequena-média dimensões (entre 4-6 mm de comprimento) (Service, 1986). O corpo de um culicídeo, como insecto que é, encontra-se dividido em cabeça, tórax e abdómen (**Figura I.2A.**).

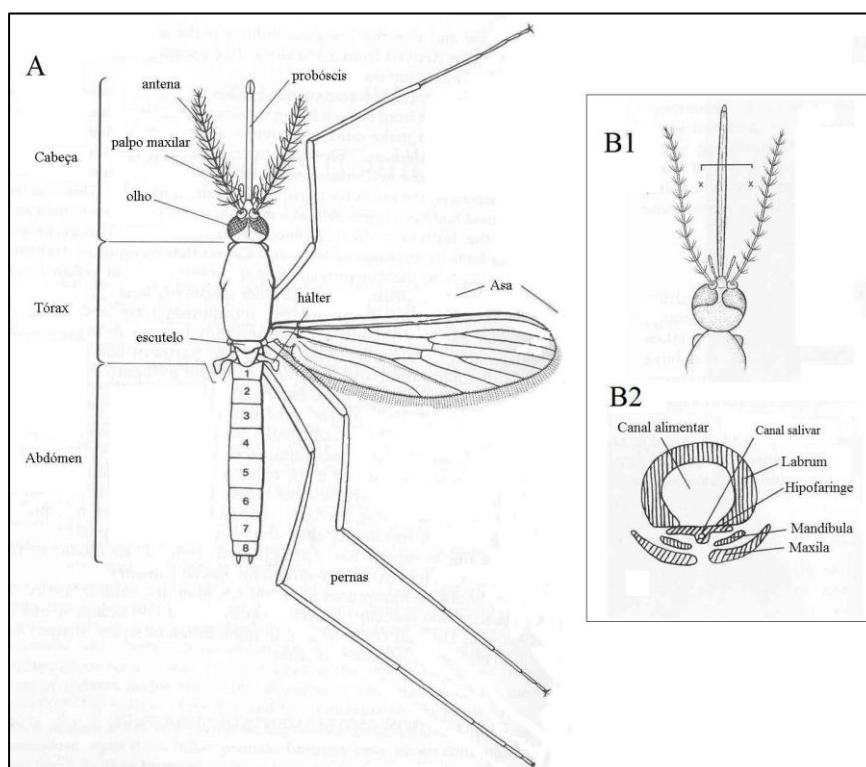


Figura I.2. Morfologia básica de um mosquito adulto fêmea. (A) Estrutura externa; (B) armadura bucal: (1) cabeça e apêndices e (2) corte da secção designada de x no probóscis, das estruturas da armadura bucal.

Adaptado de Richards & Davies, 1984 e de Marquardt, 2010

A cabeça possui um notável par de olhos compostos reniformes, dicótomos e sem ocelos. Entre os olhos surgem um par de antenas filamentosas e segmentadas, altamente sensoriais, revestidas de pêlos e com um acentuado dimorfismo sexual – em geral, plumosas no macho e pilosas nas fêmeas (**Figura I.3.**). Paralelamente às antenas, encontra-se um par de palpos maxilares que variam de tamanho consoante a subfamília e o sexo. Estes localizam-se lateralmente ao probóscis, sendo, igualmente, estruturas sensoriais. Em contraste aos culicíneos, em que os palpos das fêmeas são curtos, nos anofelíneos os palpos de ambos os sexos são tão longos como o probóscis com a extremidade dilatada nos machos (**Figura I.3.**). A armadura bucal evoluiu para formar o probóscis, adaptado à perfuração de tecidos e sucção de substâncias (Clements, 1992). O probóscis é formado por um lábio (*labium*), um *labrum*, uma hipofaringe oca e por quatro peças pares e simétricas, as mandíbulas e maxilas (**Figura I.2B2.**).

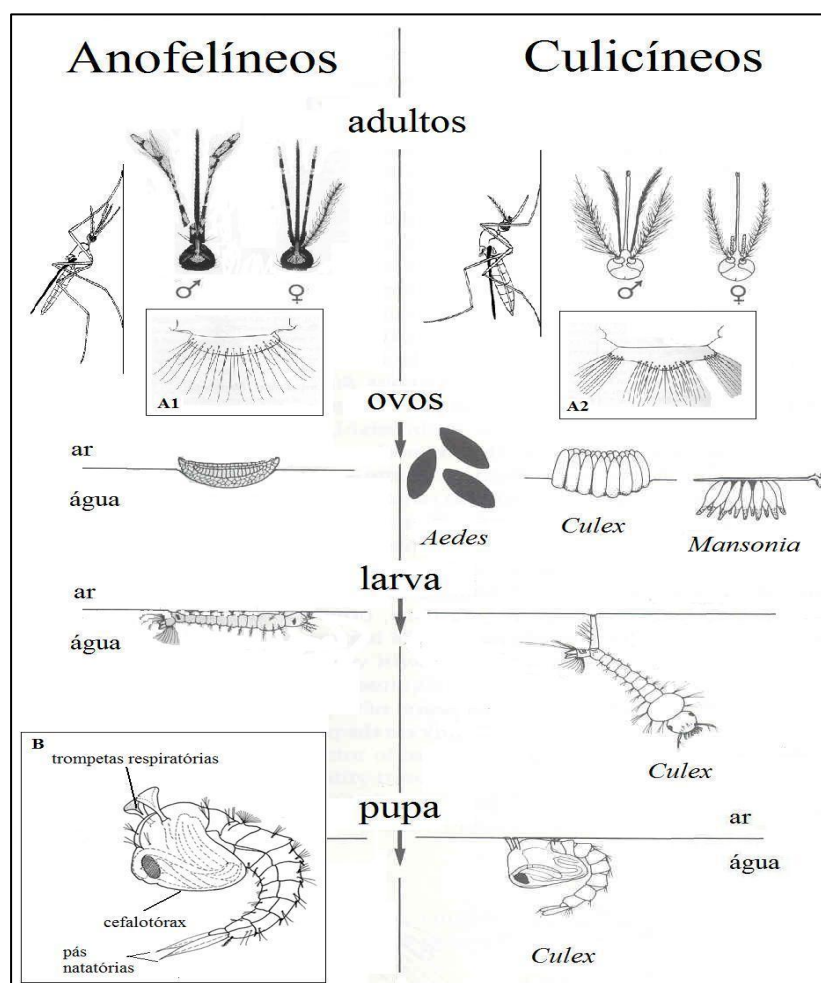


Figura I.3 Quadro com as principais diferenças entre mosquitos da subfamília Anophelinae (esquerda) e Culicinae (direita). (A) Diferenças no forma do escutelo em: (1) mosquitos anofelíneos e (2) mosquitos tipicamente culicíneos; (B) Estrutura externa de uma pupa *Anopheles*.

Adaptado de Richards & Davies, 1984; Service, 2008 e de Marquardt, 2010

O tórax resulta da fusão de três segmentos, o prototórax, mesotórax e o metatórax, cada um possuindo um par de patas. As asas funcionais inserem-se no mesotórax e o par modificado no metatórax. Na face superior do tórax encontra-se o escutelo que nos permite diferenciar anofelíneos (escutelo simples) dos culicíneos (escutelo trilobado) (**Figura I.3A1 e 3A2**, respectivamente). As paredes laterais do tórax apresentam numerosas sedas, imprescindíveis para a identificação, bem como as escamas presentes nas patas e asas. O abdómen possui oito segmentos visíveis revestidos por sedas e/ou escamas. Nos últimos dois segmentos encontram-se a genitália feminina ou masculina (com um par de forcípulos).

I.4.1.1. Ciclo de vida dos mosquitos

O ciclo de vida dos mosquitos holometabólicos completa-se em dois ambientes distintos, um aquático e outro terrestre. As larvas e pupas desenvolvem-se numa variedade de habitats aquáticos (poças de chuva, campos de arroz, lagos, pântanos, etc.), inclusive em ambientes artificiais (vasos, pneus, etc.). Contudo, as diferentes espécies de mosquitos tendem a fazer a oviposição e, conseqüente desenvolvimento, em sítios com propriedades físicas e químicas específicas (Mullen & Durden, 2009). Dos ovos eclodem as larvas, que passam por 4 estados de desenvolvimento frequentemente designados de L1 a L4. Após consecutivas metamorfoses larvares, o estágio L4 muda para pupa de onde eclodem os mosquitos adultos (**Figura I.4.**). O período larvar em regra demora de 5 a 7 dias em países tropicais, mas muitas das espécies necessitam de 7-14 dias. Nas zonas temperadas, o período larval pode durar semanas a meses (Service, 1986). O período pupal leva, normalmente, 1 a 2 dias até emergirem os adultos para o meio aéreo. O ciclo de vida torna-se completo, aquando da procura do mosquito fêmea de um hospedeiro para realizar a refeição sanguínea e consecutiva maturação dos ovos, reiniciando-se com a oviposição dos ovos em local adequado.

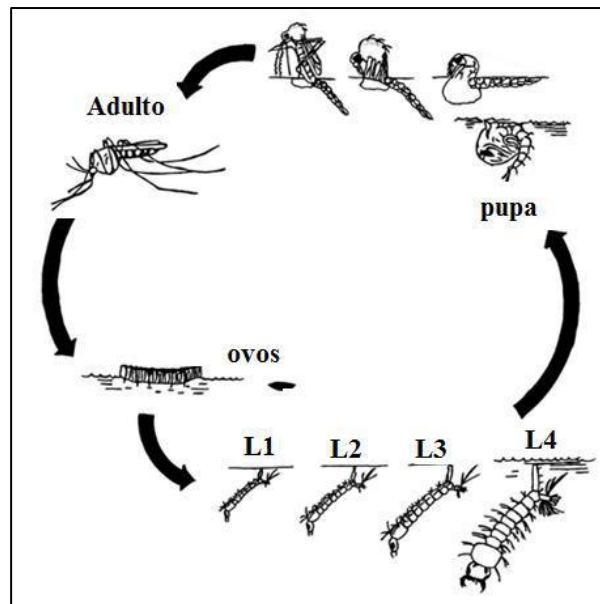


Figura I.4. Ciclo de vida de um mosquito fêmea (Diptera: Culicidae). Dos ovos eclodem as larvas, que passam por 4 estados de desenvolvimento (L1, L2, L3 e L4). O estágio larvar L4 muda para pupa de onde eclodem os mosquitos adultos.

Adaptado de <http://www.wuvcd.org/mosquito/lifecycle.html> (acedido em 8 de Janeiro de 2011)

I.4.1.1.1. Alimentação sanguínea e ciclo gonotrófico.

Maior parte dos mosquitos copula após emergir do estado de pupa. Esperma, introduzido pelo macho irá ficar acumulado na espermateca da fêmea e servirá para fertilizar todos os óvulos produzidos para cada uma de todas as posturas que a fêmea realiza durante a sua vida. Assim, é necessário apenas uma cópula para que a fêmea fique inseminada para toda a sua vida adulta.

Os mosquitos fêmeas da maioria das espécies precisam picar um hospedeiro e realizar refeição sanguínea para obter os nutrientes necessários ao desenvolvimento dos seus ovos. Neste caso as fêmeas são designadas de anautogénicas, em oposição às fêmeas autogénicas que conseguem realizar pelo menos uma primeira postura sem efectuarem uma refeição sanguínea. A velocidade da digestão da refeição sanguínea depende da temperatura. No caso da maior parte das espécies tropicais estas precisam apenas 2 a 3 dias, mas em climas mais frios a digestão poderá durar de 7 a 14 dias (Service, 1986).

Depois da refeição sanguínea, o abdómen do mosquito fica dilatado e de cor avermelhada. À medida que ocorre a digestão o sangue vai escurecendo e a parte posterior do abdómen da fêmea vai-se tornando mais clara, devido ao desenvolvimento dos oócitos. Quando a digestão se completa, o abdómen dilatado torna-se totalmente esbranquiçado e algo translúcido, sendo possível observar ao esteromicroscópio os oócitos já maduros com a forma em banana, típica dos ovos. Nesta condição, diz-se que a fêmea se encontra grávida e pronta a realizar a oviposição, em ambiente propício ao desenvolvimento larval. A fecundação ocorre quando os oócitos passam pelo oviducto, durante a oviposição. Este processo de procura de hospedeiro, alimentação sanguínea, digestão e simultânea maturação dos ovos, seguido de oviposição, que se repete várias vezes ao longo da vida da fêmea, é referido como ciclo gonotrófico (**Figura I.5.**) (Service, 2008).

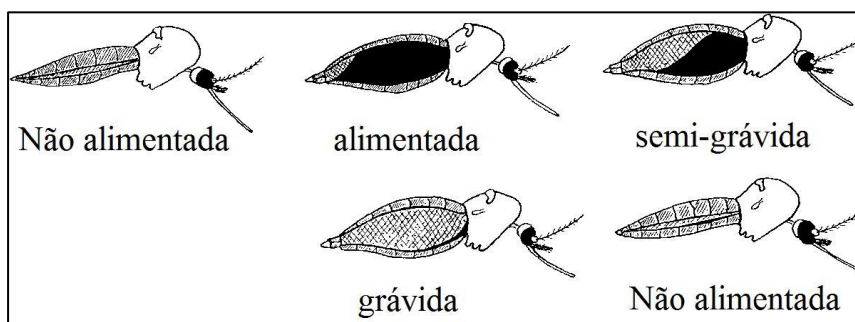


Figura I.5. Representação esquemática do ciclo gonotrófico de um mosquito fêmea. Cada ciclo começa na procura de um hospedeiro por uma fêmea não alimentada, que passa a alimentada, semi-grávida e grávida. O ciclo completa-se após oviposição, quando a fêmea encontra-se novamente não alimentada e pronta a realizar refeição sanguínea.

Adaptado de Service, 2008.

I.4.1.1.2. Oviposição e biologia dos imaturos.

Dependendo das espécies, as fêmeas dos mosquitos podem depositar cerca de 30 a 500 ovos por oviposição. Muitos mosquitos, tais como as espécies de *Anopheles*, *Culex* e alguns *Mansonia*, depositam os seus ovos directamente na superfície aquática. Nos *Anopheles* os ovos apresentam-se isolados, enquanto nos *Culex* estão agrupados em “barquinha” e flutuam graças a fenómenos de tensão superficial (**Figura I.3.**). Em ambos os géneros, os ovos não resistem à dessecação acabando por secar e morrer. Outros mosquitos, como é o caso dos géneros *Aedes* e *Haemagogus*, não depositam os ovos directamente na água, mas sim acima da linha de água ou substratos húmidos

(*e.g.* lama, vasos ou folhas). Estes ovos possuem uma grande capacidade de resistir à dessecação durante semanas, meses ou mesmo anos, permanecendo viáveis e capazes de eclodir em condições propícias. A eclosão de ovos em climas tropicais pode ocorrer entre 2 a 3 dias, mas em condições de temperaturas menos elevadas após 7 a 14 dias ou mais (Service, 2008).

As larvas dos mosquitos podem ser distinguidas de outros insectos dípteros pela ausência de apêndices locomotores e, por possuírem um tórax mais volumoso que a cabeça e abdómen. Possuem uma cabeça bem desenvolvida e quitinizada, com um par de antenas e um par de olhos compostos. A maior parte das espécies apresenta escovas orais que “varrem” a água para a ingestão de partículas mínimas de comida. O abdómen apresenta dez segmentos dos quais nove são visíveis. No oitavo segmento abdominal encontra-se inserido um par de espiráculos (subfamília Anophelinae) ou um sifão alongado (subfamília Culicinae e Toxorhynchitinae) (**Figura I.3.**), o que permite distinguir as duas subfamílias com importância médica (Clements, 1992; Service, 2008). Todo o corpo das larvas apresenta uma quetotaxia acentuada que é fundamental para a identificação específica.

As pupas dos culicídeos são móveis e aquáticas, com corpo em forma de “vírgula”. A pupa difere da larva devido a ter o corpo dividido apenas em cefalotórax, com um par de trompetas respiratórias na sua região dorsal, e um abdómen, com 8 segmentos visíveis e que termina com duas “pás” natatórias flexíveis (**Figura I.3B.**). Apresenta um tegumento semi-rígido que confere protecção ao desenvolvimento de algumas estruturas, como os olhos compostos, asas, apêndices locomotores e probóscis. A pupa não se alimenta e após 1 a 3 dias, dependendo do clima e espécie, metamorfoseia-se na forma adulta. Uma característica particular, observada em laboratório de colónias com mosquitos, é que, os machos de uma postura emergem antes das suas fêmeas irmãs (sensivelmente 24 horas antes). As pupas dos diferentes géneros de mosquitos são muito semelhantes entre si, distinguindo-se essencialmente através das suas sedas abdominais (Service, 1986; Clements, 1999).

I.4.1.1.3. Aspectos da biologia e comportamento do adulto.

Como já foi referido, as fêmeas da maior parte das espécies de mosquitos necessitam de pelo menos uma refeição sanguínea, antes ou depois de acasalar, para completar o ciclo gonotrófico. As fêmeas são atraídas para um determinado hospedeiro devidos aos estímulos emanados por este, como o odor corporal, dióxido de carbono ou calor. A visão normalmente tem um papel minoritário na orientação do hospedeiro, contudo algumas espécies são atraídas pela forma ou movimento do hospedeiro. De certa forma, cada uma das espécies sente uma maior afinidade por um determinado tipo de hospedeiro, quer este seja humano (antropofílicas) ou outro animal vertebrado (zoofílicas). Algumas espécies de mosquitos alimentam-se frequentemente no interior das casas e designam-se de endofágicas, enquanto que outras se alimentam fora das habitações, sendo designadas de exofágicas. Os hábitos de picada dos insectos vectores são determinantes na epidemiologia da transmissão de uma dada doença, tal como o seu sítio de repouso após refeição sanguínea o é para possíveis medidas de controlo de vectores (Service, 1986).

Ambos os géneros (macho e fêmea) de culicídeos recorrem ao uso de açúcares presentes no néctar de flores ou órgãos de plantas como fonte de energia. Contudo, apesar de serem essenciais para a sobrevivência dos machos, mantém-se a dúvida se as fêmeas recorrem ao néctar durante o ciclo gonotrófico. Alguns estudos demonstram que as fêmeas realizam refeições sanguíneas logo após a ingestão de néctar, retendo-o enquanto a digestão sanguínea se processa. Para além disso, foram encontradas elevadas percentagens de frutose numa recente oviposição de fêmeas *Culex tarsalis* Coquillett, 1896, evidenciando que as fêmeas se alimentam de néctar a poucas horas da oviposição. Em contrapartida, outros testes laboratoriais demonstram que grande parte das fêmeas de alguns mosquitos precisa de pouco ou nenhum açúcar, como é o caso de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 cujas as fêmeas usam apenas a refeição sanguínea como fonte de energia e nutrientes. Encontrar açúcares envolve respostas aos odores das plantas através da estimulação dos órgãos sensoriais (Clements, 1999).

I.4.1.1.3.1. Acasalamento

Os Diptera diferem de outros insectos pela sua habilidade de copularem durante o voo. Os insectos usam uma variedade de estímulos para a aproximação de machos e fêmeas para o acasalamento, como por exemplo feromonas voláteis e sons. Existem vários modos como ocorre a reunião entre machos e fêmeas conespecíficos: (i) os machos formam enxames aéreos em volta de marcadores físicos e estes servem de pólo atractivo para as fêmeas; (ii) os machos formam enxames perto dos hospedeiros na tentativa de inseminar fêmeas que a este se dirigem para efectuar uma alimentação sanguínea e; (iii) alguns machos isolados aproximam-se das fêmeas em repouso copulando com estas em seguida. Grande parte das espécies de *Anopheles*, *Culex* e *Mansonia* tendem a copular ao anoitecer. Pelo contrário, no caso em que os machos se aproximam isolados, as fêmeas conspecíficas em regra apresentam comportamentos de repouso diurnos, podendo possuir sedas metálicas que permitem a sua detecção: *e.g.* *Sabethes*, *Haemagogus* e *Toxorhynchites*. Cada fase do acasalamento contribui para o sistema de reconhecimento específico, que tem de ocorrer entre machos e fêmeas conespecíficos. A maturação sexual dos machos inclui a capacidade de erguer os pêlos das antenas. As fêmeas, da maior parte das espécies, não estão sexualmente receptivas durante as primeiras 30 a 60 horas da sua vida adulta. (Clements, 1999). Para além disto, existem estudos que indicam o envolvimento da audição dos mosquitos no acasalamento, por exemplo pelo reconhecimento sexual específico dos machos ao serem atraídos pelo som das asas das fêmeas da mesma espécie (Gibson & Russel, 2006).

I.4.1.1.3.2. Localização do hospedeiro – características e respostas comportamentais.

Os mosquitos possuem a capacidade de se mover em direcção a um potencial hospedeiro vertebrado como resposta a uma variedade de estímulos. Alguns dos sinais do hospedeiro são químicos, compreendendo tanto compostos orgânicos como inorgânicos; outros são físicos. O conhecimento das características e identidade do hospedeiro são essenciais para análise do comportamento do mosquito no que se refere aos seus hábitos de picada.

Recentes descobertas demonstram que os mosquitos respondem a uma variedade de estímulos químicos humanos, denominados de cairomonas, que incluem uma diversidade de odores voláteis da respiração, transpiração ou urina (Clements, 1999; Takken & Knols, 1999).

O ar expirado contém duas das maiores fontes de cairomonas para os Diptera hematófagos: vapor de água e dióxido de carbono, ambos produzidos em grandes quantidades. Por outro lado, muitos dos compostos orgânicos voláteis que se encontram no sangue são transferidos para a respiração, tais como a cetona ou butanona (Clements, 1999).

O dióxido de carbono encontra-se presente na respiração mas também na pele, passando pelas camadas dérmicas por difusão. A evaporação da água ocorre pelo mesmo processo e é denominado de perspiração insensível, sendo este mecanismo mais evidenciado nas aves. Para além do dióxido de carbono e vapor de água, muitas das substâncias emanadas pela superfície dérmica são segregadas nas diversas glândulas presentes na pele constituindo no seu conjunto o suor (Clements, 1999). Um certo número de investigações descreveu que os mosquitos respondem ao suor humano. O ácido láctico excretado através do suor está implicado como o principal componente atractivo do *Ae. aegypti*. Os humanos possuem níveis elevados de ácido láctico em comparação com outros mamíferos e aves (Smallegange *et al.*, 2009). Estudos indiciam que o uso do repelente DEET (*N,N*-dietil-*meta*-toluamida) bloqueia a atracção dos mosquitos ao ácido láctico, levando a crer que os receptores odoríferos são alvos moleculares de repelentes (Ditzen *et al.*, 2008). A taxa a que os compostos da pele volatilizam é influenciada por diversos factores, *e.g.* o seu estado iónico ou solubilidade dos lípidos na superfície dérmica (Clements, 1999; Takken & Knols, 1999). Assim é possível que as fêmeas de mosquito evidenciem preferência por picar determinadas zonas do corpo em detrimento de outras. Este é o caso de *An. stephensi* Liston, 1901 que demonstrou diferentes tipos de atracção aos odores emanados pela mão e antebraço (Mukabana *et al.*, 2002).

No caso da urina, os estudos existentes incidem especialmente sobre moscas tsé tsé e sobre o seu comportamento relativamente aos fenóis existentes neste fluido. Apesar dos aminoácidos não serem considerados compostos voláteis, muitos mosquitos mostraram-se receptivos a estes compostos orgânicos (Clements, 1999).

Outro factor importante na atractividade dos mosquitos por determinado hospedeiro é o calor emitido por este. Os mosquitos conseguem detectar emanções de calor dos hospedeiros vertebrados a curtas distâncias. A taxa e a maneira como ocorre a emanção de calor dos animais, varia de acordo com as condições do local onde são inseridos (Clements, 1999).

O modo como o calor e os odores libertados por uma determinada fonte são transportados pelo vento através de correntes de ar, influencia a capacidade de um insecto os detectar. Esta situação pode ser ilustrada pela **Figura I.6.**, que mostra o modo de dispersão destes tipos de estímulos emanados por um hospedeiro no interior de uma habitação (Wernsdorfer & McGregor, 1988). Isto possui um interesse biológico na definição do padrão da distribuição dos insectos e no tipo de resposta destes à fonte de alimento (Clements, 1999).

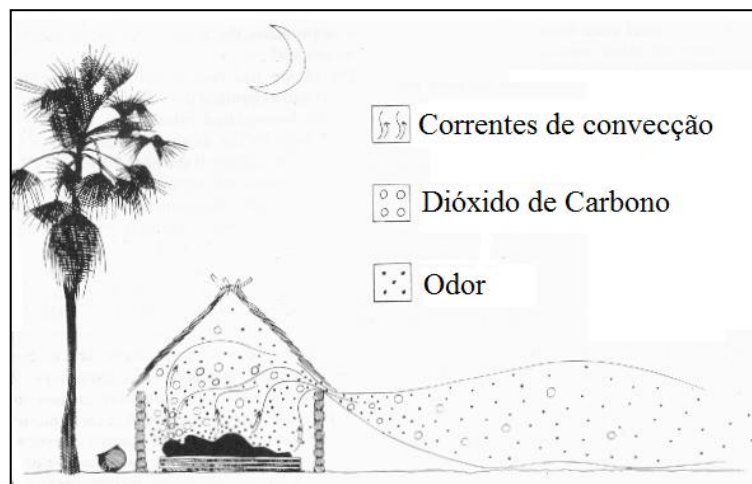


Figura I.6. O modo como um hospedeiro influencia a capacidade de um insecto o detectar.

Adaptado de Wernsdorfer & McGregor, 1988.

As estruturas dos insectos que percebem os estímulos olfactivos, designadas genericamente de *quimiosensilla* olfactivas, situam-se no flagelo antenar e nos palpos maxilares. Estas detectam os sinais químicos e traduzem-nos em respostas que variam de acordo com a

percepção da quantidade e qualidade dos odores. Já as *termosensilla* estão limitadas na sua distribuição à extremidade do flagelo antenar e ao contrário das *quimiosensilla*, nas quais o estímulo pode estar presente ou ausente, são expostas continuamente a uma temperatura ambiente. As *sensilla* gustatórias respondem pela estimulação de moléculas na fase líquida e encontram-se presentes nos pêlos de apêndices locomotores e da cavidade bucal. Estudos electrofisiológicos sobre estas *sensilla* e a sua ligação ao sistema sensorial permitiram uma melhor compreensão de certos comportamentos dos mosquitos (Clements 1999).

A visão pode ser crucial na procura de hospedeiros por parte de algumas espécies hematófagas. Por exemplo, a resposta das moscas tsé tsé é afectada pelo movimento, forma, contraste e cor de hospedeiros artificiais. Relativamente às respostas visuais dos mosquitos o conhecimento sobre este assunto é limitado. No entanto, o papel da visão na procura do hospedeiro pode diferir entre espécies diurnas e nocturnas, sendo mais importante nos mosquitos diurnos (Clements, 1999; Mukabana *et al.*, 2004).

A habilidade do insecto para identificar a fonte de uma refeição sanguínea, actualmente é uma ferramenta poderosa para a investigação de uma variedade de questões relacionadas com os insectos hematófagos. Por exemplo, permite investigar a natureza da escolha do hospedeiro e compreender se os agentes etiológicos da doença podem interferir de algum modo na procura do hospedeiro pelo vector (Lehane, 2005). O tipo de hospedeiro preferencial e a frequência com que o insecto se alimenta são dois factores extremamente importantes na epidemiologia de qualquer doença transmitida por artrópodes. A abordagem mais comum para se determinar as preferências hemáticas de certa espécie de mosquito passa pela identificação da origem da refeição sanguínea de espécimes capturados na natureza. Esta pode ser efectuada através de meios imunológicos (ELISA) ou técnicas moleculares (“fingerprinting”, VNTRs, STRs) com recurso à PCR (Lehane, 2005). No entanto, estes resultados devem ser analisados com alguma cautela pois eles resultam de um somatório de eventos, quase sempre difíceis de contabilizar. A preferência natural do insecto, o tipo e número de hospedeiros presentes na área de estudo, o tamanho desses hospedeiros e o seu

comportamento defensivo são alguns dos principais factores que, em condições naturais, podem afectar o padrão da alimentação de um mosquito (Pitts & Zwiebel, 2006; Kweaka *et al.*, 2010).

Em inquéritos epidemiológicos de doenças transmitidas por mosquitos, a preferência de certa espécie mosquito em se alimentar em humanos é expressa pelo índice de antropofilia (HBI – *human blood index*). Este é definido como “a proporção de fêmeas recém alimentadas colhidas em repouso que apresentam sangue humano no seu estômago” e traduz o grau de contacto existente entre o mosquito vector e os humanos (Clements, 1999). Este índice é um parâmetro populacional pois pode apresentar variações consideráveis quando se compara duas ou mais populações da mesma espécie.

I.5. Recurso aos repelentes em alternativa dos insecticidas: papel crucial no controlo de Mosquitos (Culicídeos).

Milhões de pessoas são infectadas diariamente por mosquitos transmissores de doenças, contraíndo doenças como a malária, dengue, filariose, leishmaniose e tripanossomose. Só a malária mata 3 milhões de pessoas anualmente, incluindo uma criança em cada trinta segundos. Maior parte destas doenças possui um significativo impacte social e económico, em particular nos países tropicais o que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO – *World Health Organization*) a declarar o mosquito como “inimigo público número um” (Fradin & Day, 2002; Zaim & Guillet, 2002; Karunamoorthi & Sabesan, 2009). Problemas financeiros e de gestão, assim como as alterações ambientais, a resistência dos vectores aos insecticidas e dos patogénicos aos fármacos, o aumento e respectiva mobilidade das populações humanas, contribuíram para o recente incremento da prevalência de doenças transmitidas por vectores (Zaim & Guillet, 2002).

O controlo vectorial representa uma parte importante na estratégia global actual para a prevenção das principais doenças transmitidas por artrópodes. Tem um papel vital na prevenção da malária e é única opção prática para a dengue, doença de Chagas, entres outras. Os produtos

químicos continuam a ser o elemento mais importante numa abordagem integrada para o controlo de vectores. No entanto, o reservatório de insecticidas seguros e rentáveis tem vindo a esgotar, devido ao aumento de resistências verificadas nos vectores. Os factores económicos também têm limitado o investimento na pesquisa e desenvolvimento de novos compostos e nas suas aplicações para o controlo em saúde pública de pragas e vectores (Zaim & Guillet, 2002).

Nos últimos anos, os repelentes ganharam um crescente interesse em saúde pública na protecção contra vectores (Pennetier *et al.*, 2007). Os repelentes possuem um papel importante na protecção humana contra as picadas de insectos. Um repelente eficiente e seguro poderá ser útil na redução do contacto humano-vector e, consequentemente ajudar na interrupção da transmissão de doenças por vectores (Karunamoorthi & Sabesan, 2009; Logan *et al.*, 2010). Os repelentes de insectos são uma alternativa económica ao controlo vectorial por insecticidas (Vatandoost & Hanafi-Bojd, 2008). Contudo, devido possuírem uma vida residual curta, não permitem um uso a longo prazo para protecção pessoal. A aplicação de repelentes em tecidos, roupas ou redes é um assunto relativamente inexplorado que tem benefícios potenciais em termos de segurança, nomeadamente na redução da exposição directa a químicos mais tóxicos. Por outro lado, as redes mosquiteiras impregnadas com uma combinação de um repelente sintético e um insecticida não-piretróide apresentaram eficácias semelhantes às redes impregnadas com piretróides. Esta solução pode ser uma alternativa futura promissora, tendo em conta os níveis de resistência aos insecticidas piretróides que já se observam em mosquitos vectores (Pennetier *et al.*, 2007; Pennetier *et al.*, 2010).

I.5.1. Formas de controlo de vectores com importância médica

Para uma melhor compreensão da epidemiologia e formas de controlo de doenças transmitidas por vectores, é essencial estabelecer qual o artrópode vector responsável pela transmissão do agente patogénico (Mullen & Durden, 2009) e a relação que estabelece com o(s) seu(s) hospedeiro(s).

Grandes esforços têm sido criados para o controlo de mosquitos, mais do que para qualquer outro insecto, incluindo uma vasta literatura em operações preventivas. Várias medidas de controlo são aplicadas directamente a vectores específicos, tais como o *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 e principalmente aos vectores responsáveis pela malária. Estas medidas podem ser aplicadas a formas imaturas (larvas e pupas) e/ou a mosquitos adultos (Service, 2008).

Múltiplas estratégias foram concebidas e postas em prática para reduzir a população de mosquitos. Outras estão a ser investigadas como possíveis soluções para tornar os mosquitos menos competentes na transmissão de doenças. Entre estas estratégias estão a gestão ambiental, tratamento com insecticidas e manipulação genética de vectores (Ramirez *et al.*, 2009). Os objectivos finais de qualquer programa de controlo de insectos são: (i) tratando-se de agente de doença ou de incomodidade, a diminuição do contacto entre as populações do insecto e as populações humanas, e (ii) no caso de insectos vectores, a diminuição da transmissão do agente etiológico até do limiar crítico abaixo do qual a doença provocada por esse patógeno tende a extinguir-se. Existem vários sistemas organizativos dos diferentes métodos de controlo vectorial. Neste trabalho adoptou-se por dividir as estratégias de controlo em quatro categorias: controlo biológico, genético, físico ou ecológico e químico.

I.4.1.1 Controlo biológico

Os métodos de controlo biológico incluem a utilização de inimigos naturais da espécie vectora (predadores, competidores, parasitóides ou agentes patogénicos) e de produtos biológicos sintetizados pela própria espécie-alvo mas aplicados de forma a induzir alteração do seu desenvolvimento e/ou comportamento. São exemplos destes últimos a aplicação de hormonas juvenis que alteram todo o processo de metamorfose ou de feromonas que interferem com os processos de acasalamento. Os métodos de controlo biológico são considerados uma boa alternativa aos insecticidas devido à não produção de poluição química no ecossistema. O biocontrolo foi mais usado durante o início do século XX, mas com a disponibilidade de químicos como organoclorados

foi sendo gradualmente substituído. Além disso, este biocontrolo é mais complicado de implementar e de manter. Embora considerado um processo naturalista, apesar de a sua manipulação não ser, pode requerer a introdução no habitat de grande número de agentes predadores, parasitas ou patogénicos da espécie-alvo. Para além disso a especificidade dos agentes utilizados nem sempre se restringe às larvas e pupas dos mosquitos vectores de doenças, podendo afectar outros insectos considerados inofensivos e benéficos. O biocontrolo não conduz a uma rápida diminuição de larvas de mosquitos, pode levar vários dias ou mesmo semanas para se obter uma eficácia visível (Service, 1980; Service, 1986; Service, 2008). Numa fase precoce, a criação de modelos de controlo biológico pode ser valiosa na selecção potenciais agentes biológicos e/ou na recolha de dados importantes na definição da eficácia de um agente de controlo biológico, tais como a quantidade de presas ingeridas, tipo de estratégia reprodutiva e que tipo de influencia podem exercer factores extrínsecos como a temperatura. Embora estes modelos sejam comuns em controlo de pragas agrícolas (Finlayson *et al.*, 2010) existem poucos modelos de estudo para o biocontrolo de mosquitos vectores de doenças (Lord, 2007).

Foram desenvolvidas várias estratégias para o controlo de mosquitos através de predadores. Os predadores mais comuns são os peixes, alguns dos quais conseguem sobreviver em águas salinas, podendo ser introduzidos desta forma em habitats salgados. No entanto, maior parte dos peixes são inadequados para meios aquáticos com tendência a secar rapidamente, como é o caso de criadouros típicos de certas espécies (poças de água ou pequenos charcos). Apesar destes predadores reduzirem, nalguns casos, significativamente, o número de larvas, esta estratégia de controlo é mais eficiente quando a espécie-alvo explora um número reduzido de biótopos larvares compostos por grandes colecções de água como lagos ou campos de arroz. Noutros casos, em que a espécie vectora explora um vasto leque de criadouros, peixes larvívoras demonstraram serem ineficazes na redução das densidades da população-alvo. Outros predadores de larvas e pupas, como girinos de sapos e rãs, são considerados inefficientes como agentes de controlo (Service, 1986).

Os parasitóides distinguem-se dos parasitas essencialmente por matarem o seu hospedeiro antes de este ser capaz de se reproduzir. Estes podem ser bons candidatos para o controlo biológico, visto possuírem características desejáveis como a especificidade para uma praga, o facto de se poderem produzir em cultura e de apresentarem, em regra, um ciclo de vida simples. Além disso, os parasitóides têm sido utilizados como modelo para o estudo de factores ecológicos que possam afectar a dinâmica das populações, como por exemplo, a interacção entre diferentes espécies num dado habitat ou mesmo a alteração de parâmetros climáticos. Como resultado, existe uma vasta literatura na dinâmica hospedeiro-parasitóide, incluindo estudos teóricos para a sua utilização no controlo biológico (Lord, 2007).

Um diverso número de patógenos, tais como os vírus, bactérias, protozoários e fungos, podem causar mortalidade em estados imaturos de mosquito. Existe também diversos nemátodes parasitas que eliminam larvas de mosquitos. O mais promissor para o efeito de controlo e usado comercialmente em grande massa foi *Romanomermis culicivorax* Ross e Smith, 1976 para uma diversidade de espécies, especialmente em *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1821, em El Salvador (Peterson *et al.*, 1978) e na Colômbia (Rojas *et al.*, 1987). De todos os agentes patogénicos usados no controlo larvar de mosquito o mais usado e cuja eficácia está bem documentada é *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Berliner, 1915, frequentemente designado de *Bti*. Esta bactéria entomopatogénica ao esporular produz uma proteína criatalina, inofensiva para humanos e vida selvagem, mas que quando ingerida pelas larvas de mosquito é activada no tubo digestivo destas, provocando a sua ruptura. Após a ruptura do tubo digestivo a larva deixa de se alimentar, ficando fragilizada e tornando-se uma presa fácil para os predadores. Com a continuação do desenvolvimento da bactéria esta invade outros órgãos da larva, que acaba por perecer por septicémia generalizada. As formulações comerciais de *Bti* podem conter a proteína e/ou esporos vivos. Estas formulações podem apresentar-se em líquido, grânulos ou em pó. A aplicação de *Bti* produz reduções significativas das densidades larvares durante as primeiras 24 horas após aplicação. No entanto, devido não haver multiplicação bacteriana, após uma a duas semanas é

frequente ocorrer uma recuperação do número de larvas, obrigando a que o processo tenha ser repetido em diversas aplicações, tal como os larvicidas químicos. Outro patogénico similar, *Bacillus sphaericus* Meyer e Neide, 1904 mata larvas de mosquitos da mesma gama, mas é mais eficiente em alguns habitats. Este organismo é mais eficaz em meios com poluição orgânica e especialmente contra as espécies *Culex*. Ambas as espécies de bacilos actuam mais como um insecticida microbiano do que propriamente como um agente biológico que se recicla e se mantém no meio ambiente (Service 1986; Lord, 2007; Service, 2008).

Em comparação ao que acontece com os insecticidas químicos existem poucos casos relatados de resistência ao *Bti* e *B. sphaericus*. Alguns destes referem-se a colónias de laboratório, outros a ocorrências em populações naturais. Uma população *Culex quinquefasciatus* na Tailândia provou ser resistente a *B. sphaericus*, a apesar de se manter sensível o *Bti* e existem relatos de uma população de *Culex pipiens* Linnaeus, 1758, em Nova Iorque, ser resistente ao *Bti*. Estes estudos demonstram, ao contrário do que vulgarmente se assume, que os mosquitos podem tornar-se resistentes aos agentes bacterianos usados no controlo vectorial (Service, 2008).

I.5.1.2 Controlo genético

Os métodos de controlo genético mais são direccionados para as formas adultas do que imaturas, podendo ser considerados uma variante das estratégias de controlo biológico (Service, 1986; Service, 2008). O seu objectivo é provocar ou induzir na espécie-alvo alterações genéticas desvantajosas para esta ou para o agente etiológico que transmite. Existem diversas abordagens, pelo menos em teoria, que podem ser aplicadas para o controlo de mosquitos e outros vectores. Estas incluem o método de libertação de insectos estéreis ou técnica de esterilização do insecto (SIT – *sterile insect technique*), na qual machos esterilizados por irradiação ou processos químicos são libertados para acasalarem com fêmeas da população natural, causando a deposição de ovos estéreis. Esta técnica obriga à colonização de um grande número de mosquitos em laboratório, sua separação de acordo com o género (macho/fêmea), esterilização e libertação em massa na natureza

(Pates & Curtis, 2005). O objectivo é introduzir um elevado número de mosquitos estéreis, com uma maior, ou pelo menos idêntica, vitalidade e robustez do que os machos das populações nativas, para que a competição sexual seja favorável aos machos libertados e ocorra uma consequente diminuição/eliminação da população vectora (Service, 1986; Service, 2008). De modo a testar a competência de acasalamento de machos quimioesterilizados de algumas espécies de *Anopheles* e *Aedes*, estes foram marcados fluorescentemente e libertados no meio selvagem, mostrando um nível moderado de competência no acasalamento. No que diz respeito à dispersão dos machos estéreis, *Aedes aegypti* mostrou estar limitado a menores migrações do que o *Culex quinquefasciatus* ou *Anopheles albimanus*. Muitos acreditam que uma aplicação bem sucedida de SIT está limitada às espécies em que as fêmeas são monogâmicas. A aplicação da SIT em mosquitos iniciou-se à trinta anos atrás, na Índia e em El Salvador, tendo esta estratégia de controlo sido interrompida por motivos políticos e não pela eficácia do método (Pates & Curtis, 2005; Dame *et al.*, 2009).

O controlo genético envolve também a introdução de factores genéticos numa população selvagem de insectos de modo a torná-la inofensiva para o homem. Na actualidade, há um crescente interesse no uso de transgénicos direccionados para a inviabilização da progenia das fêmeas, sem recorrer a radiação ou esterilização química (Pates & Curtis, 2005).

Outra abordagem é a criação de mosquitos transgénicos em laboratório, portadores de genes que inviabilizam a capacidade do insecto transmitir patogénios aos humanos, tais como o plasmódio da malária ou arbovírus. Estes genes seriam introduzidos nas populações nativas por libertação dos mosquitos geneticamente modificados e subsequente copula destes com a população-alvo. Contudo, é necessário reconhecer que tais genes podem vir a exercer forte selecção nos mecanismos de evasão do patogénico. Este problema poderá ser evitado pela incorporação de um factor genético que afecte, não a sua competência vectora do mosquito, mas sim a sua capacidade vectorial tornando-o inofensivo, por exemplo, pela alteração de comportamento alimentar (*i.e.* passando a ser zoofílico). Na realidade, nenhuma destas abordagens genéticas são simples, sendo mais difíceis de implementar do que os métodos convencionais como, por exemplo, a aplicação de insecticidas. Para

além disso a logística e a ética desta abordagem genética continuam a ser debatidas com rigor (Pates & Curtis, 2005; Service, 2008).

I.5.1.3 Controlo físico (mecânico ou ambiental)

O controlo de mosquitos por métodos físicos (também designados de mecânico/ambientais ou ainda ecológicos) é baseado na alteração do meio físico da espécie-alvo de modo a torná-lo adverso ao seu desenvolvimento ou proliferação. A abordagem mais óbvia seria eliminar todos os potenciais criadouros larvares de mosquitos. Criadouros de maiores dimensões podem ser eliminados por drenagem e os peridomésticos através de acções individuais como, por exemplo, pelo preenchimento de buracos nas árvores ou pela eliminação de pequenos contentores de água (*e.g.* latas, potes). Outra medida passível de contribuir para a diminuição da densidade de mosquitos é introdução de um saneamento adequado. Este contribui para eliminação de águas estagnadas com elevado teor de matéria orgânica, locais preferenciais para a criação, por exemplo, de *Cx. quinquefasciatus*, e torna as populações humanas independentes do armazenamento de água em contentores, ajudando na redução de alguns criadouros, por exemplo, de *Aedes aegypti*. No entanto a eficácia destas abordagens depende da espécie que se pretende controlar e da região em causa. Assim, a eficácia, exequibilidade e sustentabilidade de um programa de controlo baseado na erradicação de possíveis criadouros, têm de ser avaliadas individualmente para cada área (Service, 2008).

A aplicação de métodos ecológicos aos estados adultos pode ser difícil de implementar devido ao investimento financeiro implicado, por exemplo, no melhoramento das infra-estruturas populacionais ou mesmo na utilização massiva de armadilhas numa dada área. A redução de picadas por mosquitos pode ser conseguida através do uso de redes mosquiteiras ou metálicas em portas, janelas e ventiladores de casas, hospitais ou outros edifícios. Contudo, torna-se essencial uma manutenção rotineira, bem como uma ventilação e luminosidade reduzida (Service, 1986). O

recurso a cinturas zooprofiláticas pode ser um meio alternativo mais acessível. No entanto é aplicável apenas a vectores parcialmente zoofílico e por vezes pode levar a resultados inesperados.

I.5.1.4 Controlo químico

O controlo químico é implementado através da aplicação de insecticidas, reguladores de crescimento sintéticos, repelentes ou atractantes que de um modo directo ou indirecto diminuem as densidades da população de mosquitos ou limitam o contacto entre estas e a população humana.

Um dos primeiros químicos usados na eliminação de criadouros de mosquitos era designado de “Paris green” (aceto-arsenito de cobre), que era aplicado na superfície da água sob a forma de pó. Actua como um veneno para as formas larvares dos mosquitos após ingestão, sendo mais eficiente para mosquitos que se alimentam à superfície, como é o caso dos anofelíneos. Estudos indicam que este insecticida pode apresentar certos níveis de toxicidade e possíveis efeitos carcinogénicos para os humanos (Service, 1986; Mazumder *et al.* 1992).

Outro método de controlo larval é a aplicação de óleos minerais na superfície da água. Originalmente eram usados combustíveis comerciais, provocando morte aos estados imaturos por asfixia. Em climas tropicais, são necessárias diversas aplicações para assegurar que as larvas eclodidas dos ovos sejam mortas antes de puparem e dar origem a formas adultas (Service, 1986).

No início da década de 40, insecticidas organoclorados residuais, tais como DDT (diclorodifeniltricloroetano), HCH (hexaclorociclohexano) e dieldrina, e mais tarde, os insecticidas organofosforados e carbamatos, iniciaram uma nova era no controlo de mosquitos. O uso de “Paris green” e óleos foi mais ou menos abandonado, devido a um melhor controlo alcançado pela pulverização de criadouros com estes tipos de insecticidas. O início do retrocesso no uso de larvicidas organoclorados deveu-se ao aparecimento de resistências aos insecticidas por parte dos mosquitos. Outro factor que contribui para a diminuição do seu uso foi o conhecimento mais aprofundado sobre a sua elevada persistência nos solos e tecidos de animais e plantas. Assim,

actualmente, a WHO não recomenda o seu uso de como larvicidas. Contudo, os organoclorados podem continuar a ser usados para vaporização residual em habitações. Os insecticidas mais usados no controlo larval dos mosquitos incluem organofosforados como o temefos (Abate), malatión ou fentião. Os piretróides, como a permetrina ou deltametrina, também podem ser usados como larvicidas. No entanto, estes compostos tendem a eliminar um elevado número de outros artrópodes, crustáceos e até mesmo peixes. Assim, o seu uso deve ser efectuado com medidas de precaução adicionais e apenas em circunstâncias especiais (Service 1986; Service, 2008).

Os reguladores de crescimento de insectos (IGRs – *insect growth regulators*), como o metopreno ou pireproxifeno, são compostos químicos que inibem a formação de quitina nos estados imaturos, e consequentemente, o seu desenvolvimento (Service, 2008). Recentemente, o controlo larval pelos IGRs tem sido recomendado devido ao baixo impacto nas outras espécies e a persistência reduzida no meio. Além disso, a relação custo/eficácia desta abordagem demonstra ser uma boa alternativa aos organofosforados, para os quais já foram observadas resistências larvares (Ramirez *et al.*, 2009).

Em relação ao controlo químico das formas adultas, as estratégias de aplicação dependem em grande parte dos hábitos de repouso da espécie-alvo.

Um dos primeiros mecanismos de aplicação de insecticida no extermínio de mosquitos em repouso foi as “Flit-guns”, assim designadas em consequência do nome comercial do insecticida pulverizado. As versões mais modernas destes aspersores individuais ainda hoje são usadas quer em pulverizações intradomiciliárias quer na nebulização de pequenas áreas de vegetação. Quando usadas de forma conveniente podem ser um método de prevenção valioso (Service, 1986).

Alguns mosquitos adultos, repousam dentro das habitações antes e/ou depois da refeição sanguínea. Este conhecimento solicita a adopção de campanhas de controlo baseadas na pulverização de superfícies interiores, como paredes e telhados de habitações ou de abrigos para animais, com insecticidas residuais (Service, 1986). A pulverização residual de interiores é

vulgarmente designada pela sigla IRS (*indoor residual spraying*) é uma das principais intervenções no controlo dos vectores da malária (van den Berg, 2009; Vatandoost *et al.*, 2009).

Quando o mosquito vector apresenta hábitos exofílicos as aplicações de insecticida têm de ser efectuadas no exterior. O principal volume de qualquer formulação líquida de um insecticida consiste no solvente sendo a quantidade do insecticida activo reduzida. Uma maior eficiência pode ser alcançada se a concentração da solução insecticida pulverizada for escassa, mas dispersa num largo volume de solvente, numa dada área. Esta aplicação é conhecida como ULV (*ultra-low-volume*), onde a solução insecticida pode ser aplicada com recurso a veículos automóveis ou aviões em áreas extensas. Os insecticidas utilizados em nebulizações ULV, em regra, actuam principalmente sobre a parcela da população culicídicida que se encontra activa podendo, no entanto, afectar parte da população que se encontra em repouso em locais expostos. A pulverização ULV pode ser usada para prevenir ou controlar actuais surtos epidémicos, sendo que em situações de emergência a pulverização aérea permite um controlo vectorial mais rápido e eficaz. Este tipo de controlo tem sido usado para reduzir drasticamente a transmissão da dengue hemorrágica na América do Norte (Service, 2008).

Um número crescente de estudos empíricos e teóricos sugerem que uma nova classe de bio-insecticidas, baseados em fungos patogénicos para insectos poderão vir a ter um papel relevante no controlo vectorial. A técnica consiste na aplicação de esporos secos nas superfícies de repouso para mosquitos que irão infectar e matar a maioria dos mosquitos expostos entre 7 a 10 dias, após exposição. Estudos demonstraram que a aplicação dos esporos apresentava um risco reduzido para a saúde humana e o meio ambiente. Uma descoberta importante destes candidatos face à resistência aos insecticidas, é que parece igualmente eficaz a matar anofelíneos metabolicamente resistentes (Farenhorst *et al.*, 2010).

Repelentes de insectos sob a forma de óleos, cremes ou aerossóis, podem fornecer protecção temporária contra a picada de insectos. Estes produtos normalmente são aplicados sobre áreas

expostas da pele. A maior parte dos mosquitos não é dissuadido de picar sobre a roupa, devendo-se, assim, usar roupa de preferência impregnada com repelentes (Service, 1986). Outro recurso para a protecção pessoal é a utilização de redes mosquiteiras impregnadas com insecticidas, usadas mais frequentemente em zonas endémicas de doenças transmitidas por artrópodes.

Como alternativa aos repelentes ou mesmo insecticidas, existe uns compostos químicos com um efeito de atracção para mosquitos, designados de attractantes, cuja função é desviar o vector do contacto directo com o hospedeiro. Estes são frequentemente utilizados em associação com armadilhas ou qualquer outro dispositivo que captura e elimina os mosquitos atraídos.

I.5.2. Principais insecticidas e mecanismos de resistência a estes associados.

Existe uma vasta literatura sobre insecticidas, o seu uso no controlo de artrópodes vectores de importância médica, veterinária e agrícola, sua classificação, propriedades e toxicidade. Neste trabalho apenas se vai descrever sumariamente os principais insecticidas e o seu papel em Entomologia Médica.

Apesar das diversas controvérsias, os insecticidas permanecem o principal, e nalgumas situações, o único método eficaz no controlo de vectores e, portanto na redução da transmissão de doenças. Contudo, podem existir sérias implicações no uso de insecticidas e outros químicos ditos seguros, nomeadamente, a contaminação do meio ambiente. Além disso, devido ao seu uso frequente, como primeira linha de protecção, várias populações de insectos têm-se tornado resistentes aos insecticidas. É, assim, crucial um investimento no desenvolvimento de métodos de controlo biológico e genético exequíveis ou, uma maior integração do uso de insecticidas com outras medidas de controlo de modo a minimizar o risco de aparecimento de resistências (Service, 1980).

A resistência aos insecticidas por vezes só é detectada quando a ineficácia destes se torna evidente. Existe dois tipos de resistência nos insectos, a fisiológica, a mais importante, e a

comportamental. O desenvolvimento de resistência fisiológica numa população de insectos está dependente do aparecimento de alterações genéticas e da sua selecção artificial devido ao uso continuado de insecticidas. A progressão da resistência numa população depende de vários factores incluindo a proporção de indivíduos originalmente resistentes, o grau de isolamento da população em comparação com as populações vizinhas não sujeitas a insecticidas, a taxa de reprodução e o tempo de geração do insecto. Este tipo de resistência pode surgir de diferentes mecanismos: (i) através do incremento da capacidade de um insecto metabolizar o insecticida num produto menos tóxico (designada de resistência metabólica); (ii) da absorção e armazenamento do insecticida nos tecidos; (iii) do aumento da impermeabilidade do tegumento ou da taxa de excreção do insecticida ou, ainda (iv) pela diminuição da sensibilidade do alvo-local deste (denominada de resistência local-alvo). Quando se suspeita de resistência nos vectores, devem-se realizar testes standardizados pela WHO para determinar o nível de resistência. Basicamente, estes testes envolvem a exposição de um elevado número de mosquitos a diferentes concentrações, de um ou mais insecticidas, e a contabilização do número que morrem após um determinado período de exposição (Service, 1980).

A resistência comportamental diz respeito a capacidade dos vectores evitarem o contacto com o insecticida, quer por mudanças de habitat quer por alteração de comportamento. Um exemplo de mudança comportamental é a alteração dos hábitos de repouso: mosquitos que originalmente são endofílicos mas que devido ao contacto continuado com o insecticida tornaram-se predominantemente exofílicos. A resistência resultante de mudanças comportamentais/ecológicas são consideravelmente mais difíceis de reconhecer e de quantificar do que as fisiológicas. Contudo, a WHO disponibiliza um *kit* padrão para medir a irritabilidade nos mosquitos (Service, 1980).

O aparecimento de resistências pode ser monitorizado periodicamente através da determinação da sensibilidade da população vectora. A possibilidade da diminuição da sua ocorrência pode ser conseguida pela utilização alternada de dois ou mais insecticidas, com modos de actuação distintos, ou pela combinação do insecticida com um sinergista. Um sinergista é um químico que quando adicionado a um outro produto potencia a reacção deste, mas que isolado tem

pouco ou nenhum efeito. Por exemplo, butóxido de piperonilo pode ser adicionado em pequenas quantidades a piretróides sintéticos, possibilitando um menor uso de insecticidas dispendiosos.

O modo de actuação dos insecticidas é variado. Originalmente, os insecticidas organoclorados eram designados de hidrocarbonetos clorados devido possuírem hidrogénio, carbono e cloro com algum oxigénio e enxofre. Eliminam artrópodes actuando como um veneno poderoso do sistema nervoso central. O efeito neurotóxico ocorre por alteração dos canais de sódio das membranas das células nervosas. Estes insecticidas interferem com a transmissão do impulso nervoso causando movimentos convulsivos, fases sintomáticas de excitação, paralisia e finalmente morte. A sua acção é lenta e os insectos podem não morrer até diversas horas após contacto com o insecticida. O DDT foi o primeiro organoclorado a ser produzido e usado como insecticida. Outros organoclorados são utilizados para eliminar insectos com importância médica, incluindo o HCH ou dieldrina. Apesar da sua inicial eficiência no controlo de insectos com importância médica, veterinária e agrícola, estes compostos são actualmente considerados como poluentes do ambiente. Para além disso, o seu uso indiscriminado no passado levou ao aparecimento e larga disseminação de mecanismos de resistência a este grupo de insecticidas, em particular ao DDT (Service, 1980).

Relativamente aos organofosforados, estes eliminam os insectos através da inibição da enzima acetilcolinesterase e do bloqueio da transmissão dos impulsos nervosos. Devido ao aumento da resistência aos organoclorados verificada nos insectos, os organofosforados têm sido usados como alternativa. São biodegradáveis, donde não acumulam nem persistem no meio ambiente e, consequentemente, têm menos efeitos nos organismos não-alvo. Contudo, como a maior parte dos insecticidas, não são específicos e eliminam um grande número de artrópodes inofensivos (Service, 1980).

Outros insecticidas opcionais aos organoclorados são os carbamatos. Apresentam, tal como os organofosforados, efeitos neurotóxicos por redução dos níveis de actividade da acetilcolinesterase. Alguns carbamatos, como o carbaril (Sevin), produzem uma rápida mortalidade

nos insectos semelhante aos compostos piretróides. O carbaril é bastante usado em saúde pública e pode ser formulado em sprays para matar mosquitos. Por causa da sua baixa toxicidade em mamíferos é usado, em forma de pó ou incorporado em loções, para o controlo de pulgas e piolhos (Service, 1980).

Os insecticidas piretróides são actualmente os únicos químicos recomendados pela WHOPE (World Health Organization Pesticide Scheme) para impregnação de redes, devido a sua baixa toxicidade para mamíferos e rápida actuação contra mosquitos (Hougard *et al.*, 2003; Pennetier *et al.*, 2007; Pennetier *et al.*, 2008; Pennetier *et al.*, 2009). Os estudos sobre a acção de redes impregnadas com piretróides, provaram grandes benefícios destas na redução da morbilidade e mortalidade da malária. O aparecimento de redes de longa duração eliminou a sua limitação prática de necessitarem impregnações repetidas, para renovar a eficácia do tratamento com piretróides (N'Guessan *et al.*, 2001). Uma nova abordagem na optimização de medidas antimaláricas, devido as resistências dos piretróides é à necessidade de re-impregnação nas redes mosquiteiras, é a criação de redes de longa duração tratadas com repelentes (LLRTN – *long-lasting repellent-treated nets*) (Faulde *et al.*, 2010).

Os mecanismos de resistência aos piretróides podem ser de natureza metabólica (alteração nos níveis de expressão na actividade de enzimas desintoxicantes) e de alteração do alvo-local de actuação do insecticida (mutações pontuais não silenciosas nos genes estruturais, *i.e.*, mutações *kdr*). Infelizmente, o gene *kdr* (*knock-down resistance*) que confere resistência cruzada aos piretróides e DDT tornou-se difundido em mosquitos anofelíneos, em África. A resistência pode representar uma ameaça futura ao sucesso dos programas de controlo da malária, baseados nas redes tratadas com insecticida (ITN – *insecticide-treated nets*) e na pulverização residual de interiores (IRS). Apesar dos organofosforados e carbamatos serem considerados alternativas possíveis aos piretróides, estes são considerados compostos mais tóxicos (Zaim & Guillet, 2002; Hougard *et al.*, 2003; Pennetier *et al.*, 2007; Pennetier *et al.*, 2008; Pennetier *et al.*, 2009; Pennetier *et al.*, 2010; Farenhorst *et al.*, 2010).

Alternativas a novos produtos químicos, para o uso em saúde pública, surgem muito lentamente (Zaim & Guillet, 2002). A permetrina, surgiu no grupo dos primeiros piretróides sintéticos que apresentavam boa estabilidade na presença da luz. Foi comercializado pela primeira vez em 1973, e largamente utilizado deste então como repelente e insecticida altamente eficaz contra carraças, ácaros, mosquitos e outros artrópodes. O seu mecanismo de acção requer contacto directo com o insecto, sendo inadequado para aplicações tópicas. Provoca forte excitação no sistema nervoso do insecto e bloqueia os movimentos de sódio para as células nervosas, conduzindo à paralisia. Normalmente, este piretróide é usado no controlo de infestações caseiras e programas de saúde pública, incluindo no controlo de piolhos em crianças. Pode ser usado em roupa, sapatos, redes mosquiteiras e equipamento de acampamento, necessitando uma nova aplicação em cada 5 lavagens. Foram verificados elevados níveis de toxicidade, incluindo efeitos neurotóxicos, quando este composto é usado em doses excessivas. Redes de mosquitos tratadas com permetrina oferecem uma protecção acessível e têm sido amplamente testadas no controlo da malária. Estas redes mostraram-se eficazes no decréscimo da morbilidade e mortalidade associada a esta doença (Katz *et al.*, 2008).

Normalmente, o vestuário protector de insectos hematófagos está impregnado com permetrina. Existe uma diversidade de produtos comerciais disponíveis aos viajantes, particularmente na forma de spray para aplicar sobre a roupa. Um dos maiores usos de roupa impregnada com permetrina é a das tropas militares em actividade em áreas endémicas de malária ou de outra doença transmitida por artrópodes. A protecção pessoal muitas das vezes é o único meio para prevenir o contacto com vectores diurnos ou nocturnos quando não é possível dormir sob redes mosquiteiras. Até à década de 80, o DEET era o produto recomendado para impregnação de vestuário, tendo sido substituído pela permetrina devido a este composto resistir melhor às lavagens e permanecer mais tempo nos tecidos. A produção de repelentes com libertação lenta está actualmente em desenvolvimento (Pennetier *et al.*, 2010).

I.5.3. Papel dos repelentes no controlo

Os repelentes, apesar de não serem classificados como insecticidas, são na sua grande parte compostos sintéticos, que podem ser aplicados na pele ou roupa para prevenir ataques de insectos, carraças e ácaros ofensivos. O seu uso é recomendado em situações onde outras medidas de controlo não são praticáveis ou são impossíveis de implementar. Os repelentes podem ainda ser utilizados como método de controlo complementar. O período de maior actividade de picada de uma população de insectos normalmente dura cerca de duas a quatro horas, mas o tempo de repelência de um composto químico pode variar com a actividade e o grau de transpiração do indivíduo, com a temperatura ambiente ou com a espécie de insecto (Service, 1980). No entanto, em muitas circunstâncias, a aplicação de repelente sobre a pele exposta pode ser o único meio possível de protecção contra picadas de insectos. Visto ser necessária uma única picada de um artrópode infectado para a transmissão da patologia, torna-se importante conhecer quais os produtos repelentes que fornecem uma protecção eficiente e prolongada. Os repelentes de insectos comerciais disponíveis podem ser divididos em duas categorias – os sintetizados quimicamente ou derivados de óleos essenciais (Fradin & Day, 2002).

O DEET é o repelente sintético melhor conhecido. É usado desde 1950 e considerado o produto padrão em relação a todos os outros repelentes. Contudo, existem alguns casos relatados de pessoas que apresentaram reacções severas ao DEET. Tem outros efeitos adversos à sua aplicação como a deterioração de equipamentos, especialmente os feitos de plástico (como óculos ou telemóveis) e muitos dos consumidores acham o cheiro e a sensação na pele desagradável. Outro problema relacionado com o uso de DEET diz respeito à sua curta vida residual, não oferecendo uma protecção eficaz a longo prazo. Através de ensaios laboratoriais (testes em túnel), a eficácia e persistência (mortalidade e inibição da refeição sanguínea) de misturas de repelentes com organofosforados em redes de poliéster contra *Anopheles gambiae* Giles, 1902, o principal vector de malária em África, estão a ser investigadas (Trongtokit *et al.*, 2005; Pennetier *et al.*, 2007; Logan *et al.*, 2010; Pennetier *et al.*, 2010). Estes compostos mistos (repelente mais insecticida não-

piretróide) conferem às redes mosquiteiras características semelhantes às aquelas impregnadas com piretróides. Os factores cruciais desta estratégia promissora são os compostos voláteis dos repelentes. De facto, a detecção da presença do hospedeiro por parte do mosquito depende, em grande parte dos compostos emanados pela pele, pela respiração e outros produtos excretados que são transportados por correntes de ar. A probabilidade do mosquito responder a estes indícios e a potência da resposta depende da intensidade dos estímulos derivados do hospedeiro, dos estímulos competitivos exteriores (*e.g.* odores de outras fontes, velocidade excessiva do vento), da situação interna do mosquito (*e.g.* ritmo circadiano, estado gonotrófico) e do seu genótipo (*e.g.* a componente genética da capacidade de resposta a um dado estímulo) (Pennetier *et al.*, 2008). Apesar do mecanismo de acção e do alvo molecular de DEET permanecerem desconhecidos, estudos mostraram que este composto leva a um bloqueio nas respostas electrofisiológicas, nos neurónios sensoriais olfactivos, aos odores atractivos em *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (mosca da fruta). A identificação dos candidatos a alvos moleculares para a acção do DEET poderá ajudar na construção de um repelente para insectos mais seguro e eficiente (Ditzen *et al.*, 2008).

Um dos problemas que interfere na eficácia dos insecticidas piretróides, e, especialmente na dos repelentes, é a durabilidade da sua acção. A tecnologia de micro-encapsulação é uma tentativa de resolução deste problema. Esta consiste na inclusão de um ingrediente activo numa cápsula de polímero e a sua libertação gradual para o exterior, permitindo um prolongamento da sua actividade residual. A microcápsula fornece um local de armazenamento de uma determinada quantidade do agente funcional e um escudo protector aos efeitos solares, à humidade e ao oxigénio. A libertação do agente funcional ocorre por difusão através da cápsula e/ou ruptura das microcápsulas. Suspensões micro-encapsuladas de piretróides estão a ser comercializadas como sprays residuais de interiores (WHO, 2007; N'Guessan *et al.*, 2008). A micro-encapsulação mostrou ainda as qualidades acrescidas de reduzir o impacto ambiental dos pesticidas e melhorar o seu perfil toxicológico (Kasting *et al.*, 2008). A incorporação de repelentes em produtos têxteis parece ser um

meio alternativo para fornecer uma protecção mais duradoura. A aplicação de repelentes como o DEET em redes mosquiteiras apresentou resultados promissores (N'Guessan *et al.*, 2008).

Em relação aos repelentes derivados de óleos essenciais, os humanos ao longo dos tempos têm vindo a usar compostos derivados de plantas, tais como o eucalipto e citronela ou mesmo incensos, para repelir picadas de insectos. Os óleos essenciais são uma complexa mistura de compostos orgânicos voláteis derivados de produtos secundários das plantas (Ditzen *et al.*, 2008; Nerio *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, a utilização deste tipo de repelentes de insectos têm aumentado como uma alternativa viável aos químicos sintéticos, supostamente por representarem pouco risco ao ambiente ou a saúde humana. Apesar do DEET ser o repelente de insectos *gold standard* actualmente usado, devido aos casos de toxicidade reportados na literatura, o interesse do consumidor relativamente a repelentes alternativos aumentou. Sendo assim, um largo espectro de óleos essenciais de plantas foram testados como potenciais repelentes de insectos. Estes estudos incidiram principalmente sobre as propriedades repelentes do óleo essencial de citronela e vários álcoois terpenóides. O óleo de citronela demonstrou boa eficácia contra mosquitos, quer isoladamente ou em combinação com outro produto repelente natural ou sintético. O óleo de citronela deriva de várias espécies de *Cymbopogon* (erva citronela) e contém compostos aromáticos importantes para a indústria, tais como o geraniol. Geraniol e linalol (isómeros um do outro) são álcoois monoterpenóides encontrados em muitos óleos essenciais de plantas. O óleo contém aproximadamente 30% de citronela, 40% geraniol e pequenas quantidades de limonene. A citronela é um ingrediente popular em velas ditas repelentes de insectos, sendo também usado em perfumes, sabonetes, cremes e desodorizantes. Apesar do seu potencial repelente, pode causar irritação em peles sensíveis e dermatites em alguns indivíduos. Infelizmente, há uma falta de consistência nos protocolos experimentais usados para testar estes repelentes naturais. Contudo, existe ainda a necessidade de investigar modos de assegurar a qualidade deste tipo de repelentes e determinar quais os meios mais

efectivos para a sua aplicação e uso (Mumcuoglu *et al.*, 2004; Martínez-de la Puente *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2009; Sakulku *et al.*, 2009; Bothe & Donahue, 2010).

Recentemente, a preparação de emulsões micrómetras, designadas de nano-emulsões ou mini-emulsões, emergiram como uma metodologia mais eficaz para a aplicação dérmica destes repelentes naturais. As nano-emulsões são dispersões óleo-água com gotículas de tamanho compreendidas de 100 a 600nm. Para além de terem uma cinética estável, também possuem uma solidez física a longo prazo e podem ser diluídas com água sem alteração do seu tamanho, ao contrário das micro-emulsões. Preparados de nano-emulsões com óleo de citronela encapsulado por homogeneização a alta pressão, levaram a uma libertação lenta do óleo aumentando o tempo de protecção contra mosquitos (Sakulku *et al.*, 2009).

A tecnologia por micro-encapsulação no caso do DEET permitiu um aumento na duração do efeito desejável nos têxteis. Contudo, a eficácia de repelência nos tecidos com citronela micro-encapsulada ainda não foi investigada, bem como a sua durabilidade ao longo de possíveis lavagens (Specos *et al.*, 2010).

Mais avanços na investigação sobre repelentes baseados em plantas são necessários. Existe uma urgência na produção de repelentes acessíveis no uso contra insectos vectores de doenças, em populações desfavorecidas. Os compostos naturais são considerados como um potencial produto comercial para repelentes, especialmente quando misturados com outros materiais fixadores que melhorando a sua eficácia, levam a resultados de repelência semelhante ao DEET (Trongtokit *et al.*, 2005; Nerio *et al.*, 2010).

II. OBJECTIVOS

O uso de repelentes contra picadas de insectos é uma medida de protecção pessoal efectiva para reduzir ou prevenir a transmissão doenças, tais como dengue, malária ou filariose. Os repelentes podem ser um meio de controlo vectorial económico, bem como uma alternativa ao uso de insecticidas químicos (Vatandoost & Hanafi-Bojd, 2008). Com este trabalho pretendeu-se estudar o efeito de três compostos diferentes como medida de protecção individual às picadas de mosquitos, através da sua utilização em peças de vestuário. O trabalho foi desenvolvido em três fases, cada uma com os respectivos objectivos gerais e específicos.

A primeira fase teve como objectivo geral a avaliação do efeito de repelência, em condições laboratoriais, de três tipos de tecido de algodão: (i) um impregnado com permetrina, um piretróide sintético com efeitos de repelência usado em cremes comerciais e aplicado a tecidos para protecção pessoal contra mosquitos; (ii) um segundo tecido contendo microcápsulas de DEET (*N,N*-diethyl-meta-toluamida), o repelente comercial considerado mais eficaz, usado especialmente em produtos tópicos, contra insectos e outros artrópodes e (iii) um terceiro tecido tratado com citronela micro-encapsulada, considerado um produto natural promissor com propriedades de repelência para insectos, usado numa variedade de produtos comerciais tais como velas. Todos os tecidos foram manufacturados e fornecidos pela TINAMAR, Tinturaria, SA.

Os objectivos específicos desta fase incluíram:

i) A estimativa da eficácia da repelência dos diferentes tecidos, sem e com diferente número de lavagens, para *An. stephensi* Liston, 1901 (o principal vector da malária do sudoeste asiático) incluindo o cálculo dos índices de repelência e a redução da refeição sanguínea.

ii) A comparação dos resultados obtidos com os referidos tecidos com produtos análogos existentes no mercado português.

iii) A selecção dos tecidos com melhor “performance” a serem testados nos ensaios de campo, na fase seguinte do trabalho.

Numa segunda fase, o objectivo foi determinar se o efeito de repelência observado no laboratório se mantinha em ensaios de campo quando os tecidos seleccionados na primeira fase, eram utilizados em situação real.

Foram objectivos específicos desta fase:

(i) Avaliar o efeito da impregnação no número de mosquitos fêmeas que pousavam sobre os tecidos tratados (perneiras impregnadas com permetrina).

(ii) Estimar o efeito de repelência de uma peça de vestuário impregnada (t-shirt) sobre o número de mosquitos que tentam picar os humanos em zonas expostas e não protegidas por tecido impregnado.

A necessidade de se prolongar o estudo para uma terceira fase adveio das discrepâncias observadas entre os resultados das fases anteriores. O objectivo geral desta última fase centrou-se no estudo do efeito de repelência, em condições laboratoriais, dos tecidos seleccionados na primeira fase em relação a outro mosquito vector e à espécie mais abundante na região da Comporta: *Culex theileri* Teobald, 1903. Esta fase teve como objectivos específicos:

(i) A estimativa da eficácia da repelência dos diferentes tecidos, sem e com diferente número de lavagens, para *Culex theileri* incluindo o cálculo dos índices de repelência e a redução da refeição sanguínea.

(ii) A comparação do efeito de repelência do mesmo tipo de tecido em duas espécies de mosquito diferentes.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Avaliação do efeito de repelência, em condições laboratoriais, de tecidos de algodão tratados com três compostos diferentes: permetrina, DEET e citronela.

III.1.1. Material biológico

Esta fase do trabalho experimental foi realizada com mosquitos da espécie *Anopheles stephensi* Liston, 1991. Esta espécie de mosquito proveniente do Instituto de Medicina Molecular, foi colonizada ao longo de várias gerações no insectário do IHMT e é livre de mecanismos detectáveis de resistência aos insecticidas. Foram também utilizados duas espécies de roedores: (i) exemplares fêmeas da espécie *Rattus norvegicus*, estirpe *Wistar* com idade mínima de 8 semanas, e; (ii) fêmeas *Mus musculus* da estirpe BALB/c ou CD-1, também com idade mínima de 8 semanas. Durante o procedimento experimental os espécimes vertebrados foram anestesiados por uma injeção intraperitoneal, adaptado o peso do animal, com uma solução combinada de xilazina, na forma de cloridrato, (Rompun[®] 2% da Bayer, Canadá) e ketamina (Imalgene[®] 1000, Merial Portuguesa, Rio de Mouro, Sintra). A manipulação destes animais foi supervisionada e feita de acordo com as normas directivas do Conselho da Comunidade Europeia de 24 de Novembro de 1986 (86/609/EEC) e legislação nacional em vigor (Decreto-lei 129/92 de 6 de Junho, Portaria n.º1005/92 de 23 de Outubro). Os espécimes vertebrados, foram produzidos e mantidos no Biotério do IHMT, ao cuidado da Doutora Dinora Ferreira.

III.1.1.1 Estabelecimento e manutenção da colónia de mosquitos *Anopheles stephensi* em insectário.

A colónia foi iniciada a partir de ovos e algumas larvas em vários estadios larvares da espécie de mosquitos *Anopheles stephensi* Liston 1991, gentilmente, cedidos pelo Instituto de Medicina Molecular. A colónia foi mantida ao longo das gerações a uma temperatura de 27° C ±

1°C e humidade relativa $70\% \pm 15\%$, com um fotoperíodo de 12hD:12hN. Os vários estádios larvares foram diariamente alimentados *ad libitum*, com um preparado de 1:1 de bolacha tipo Maria e TetraMenu[®]. Quando as larvas atingiam o quarto estado, as tinas eram cobertas com tule. As pupas não foram recolhidas e consequentemente os adultos emergiram nas tinas. Os exemplares adultos foram recolhidos diariamente e mantidos numa gaiola de tule (gaiola “stock”), com solução de sacarose a $\approx 8\%$ sempre disponível. As fêmeas adultas receberam ainda 2 a 3 refeições sanguíneas por semana em murganhos fêmeas da estirpe BALB/c ou CD-1 (*Mus musculus*), com idade mínima de 8 semanas.

Dentro da gaiola “stock” colocou-se, diariamente, uma tina pequena com um papel filtro dobrado em forma de cone (≈ 15 mm) e coberto de água desionizada. Esta funcionou como local de oviposição. As posturas obtidas foram colocadas em tinas novas com água e separadas, caso necessário, de modo a garantir uma densidade larvar adequada. O ciclo de desenvolvimento destes mosquitos foi assim completado e mantido por várias gerações ao longo de 9 meses.

Os indivíduos a serem utilizados nos ensaios de repelências foram recolhidos directamente das tinas e mantidos em gaiolas cúbicas 20x20 cm (mínimo 400 mosquitos/gaiola). Estes indivíduos eram mantidos 1-4 dias com solução de sacarose a $\approx 8\%$ a qual era retirada na véspera do ensaio. No dia do ensaio, fêmeas em número de 100 eram retiradas destas gaiolas e transferidas com auxílio de um tubo OMS para copos individuais. Estas fêmeas eram então mantidas nestes recipientes durante pelo menos uma hora, após a qual se dava início aos testes de repelência.

III.1.3. Composição dos tecidos impregnados com o insecticida permetrina e com microcápsulas dos repelentes DEET e citronela.

As amostras de malha tratadas com os três compostos activos foram impregnadas por tecnologia convencional, no caso da permetrina, ou por micro-encapsulação de DEET e citronela. Os tecidos foram gentilmente cedidos pela TINAMAR, Tinturaria, SA. Estes foram testados sem serem lavados e quando sujeitos a diversos ciclos de lavagem. As amostras designadas de DEET n.º 2 e DEET n.º 3 micro-encapsulados distinguem-se daquelas designadas de formulação original pelo facto das microcápsulas com DEET provirem de outros dois fornecedores diferentes. As concentrações utilizadas na impregnação/micro-encapsulação foram seleccionadas pela TINAMAR, Tinturaria, SA entidade que se responsabilizou também pela lavagem e manutenção de todos os tecidos utilizados nos ensaios de laboratório e de campo.

III.1.4. Ensaios de repelência em sistema túnel.

O sistema em túnel é um método laboratorial construído para analisar acções toxicológicas e comportamentais, que podem ocorrer durante a procura de hospedeiros por parte dos mosquitos, na presença de materiais tratados. Este sistema é um método experimental que fornece informações sobre o efeito de repelência, de inibição de refeições sanguíneas e mortalidade induzidos pela presença de têxteis tratados com repelentes e/ou insecticidas. O equipamento consiste em duas caixas rectangulares (25 cm de altura, 21 cm de largura e 60 cm de comprimento) de acrílico, as quais são divididas em dois compartimentos idênticos por uma estrutura contendo o tecido (N' Guessan *et al.*, 2008). Uma das caixas funcionou como aparato de teste, sendo nesta que é introduzido o tecido tratado, e a outra caixa como controlo. Na caixa controlo foi introduzido um tecido em tudo idêntico (cor, composição, textura, diâmetro, espessura) ao tecido em teste, mas sem ser tratado com o composto activo a ser testado (*i.e.* permetrina, citronela ou DEET).

O protocolo usado nos ensaios de repelência foi adaptado de Pennetier *et al.* (2007) e aplicado de acordo com as recomendações da WHO, 2006. A alteração ao protocolo descrito por Pennetier *et al.* (2007) refere-se ao número de orifícios efectuados e do tempo decorrido dos ensaios, nos tecidos do teste e controlo. Em vez dos originais 9 orifícios equidistantes foram efectuados 35 aberturas circulares com 1 cm de diâmetro. Os três compostos impregnados/micro-encapsulados foram analisados apenas por 120 minutos e não em 24 horas como enumerado pelos autores do protocolo. Após perfurados estes tecidos foram aplicados a uma moldura acrílica e, posteriormente, introduzidos a meio da caixa rectangular. Antes de cada ensaio, os tecidos (tratado e controlo) foram esfregados manualmente cerca de 10 vezes em cada um dos lados, para que o composto activo fosse libertado. Em cada ensaio libertou-se, simultaneamente, no lado A de cada caixa (teste e controlo) 100 fêmeas de mosquitos não alimentadas, com cerca de 3 a 5 dias. No outro compartimento, designado de B, colocou-se como isco ratos *Wistar* anestesiados (ver ponto **III.1.1.**) e imobilizados durante o decorrer da experiência. Os ensaios decorreram durante duas horas e efectuou-se a contagem do número de mosquitos, que passaram do compartimento A para o compartimento B, em diferentes tempos, nomeadamente, aos 5, 10, 20, 40, 60 e 120 minutos. Após conclusão da experiência, recolheu-se os mosquitos presentes em todos os compartimentos (A e B das caixas teste e controlo), para uma posterior contagem do número de fêmeas presente em cada divisória e do número destas que efectuaram uma alimentação sanguínea. Em seguida, através das fêmeas recolhidas no final de cada ensaio, calculou-se os parâmetros de redução de refeição sanguínea (BFI) e o índice de repelência (IRE) (ver ponto **III.1.6.**).

Para cada tecido (*i.e.* tratado com um dos compostos e sujeito a um determinado número de lavagens) efectuou-se uma série de pelo menos três ensaios sequenciais. Os tecidos utilizados, suas características e número de ensaios efectuados encontram-se listados na tabela seguinte (**Tabela III.1**)

Tabela III.1. Listagem do número total de ensaios para cada tecido por lavagem, com a respectiva cor.

Tecido	N.º Lavagens	Cor	Ensaio	N.º total de ensaios
Permetrina	Zero	Castanha	1	3
			2	
			3	
	5	Branca	1	3
			2	
			3	
	15	Castanha	1	3
			2	
			3	
		Branca	4	3
			5	
			6	
	25	Castanha	1	1
			2	
			3	
		Branca	4	6
			5	
			6	
			7	
		Castanha	1	1
			2	
			3	
	50	Branca	4	6
			5	
			6	
			7	
			1	
			2	
	60	Castanha	3	3
			4	
			5	
		Branca	6	3
			1	
			2	
DEET formulação original	Zero	Azul-escuro	1, 2, 3 e 4	4
	5	Azul-escuro	1, 2, 3, 4, 5 e 6	6
	10	Azul-escuro	1, 2, 3, 4, 5 e 6	6
	15	Azul-escuro	1, 2, 3, 4, 5 e 6	6
	20	Azul-escuro	1, 2 e 3	3
DEET n.º 2	Zero	Branca	1, 2 e 3	3
	5	Branca	1, 2, 3, 4 e 5	5
DEET n.º 3	Zero	Branca	1, 2, 3, 4, 5 e 6	6
Citronela	Zero	Verde-alface	1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7	7
	5	Verde-alface	1, 2 e 3	3

Em relação a designação de DEET n.º 2 e n.º 3, foram realizados menos ensaios visto o objectivo ter sido comparar a repelência de ambos com o tecido DEET micro-encapsulado na sua formulação original.

III.1.5. Ensaios com malha impregnada da *Petit Patapon*[®] para testar o efeito da repelência com a espécie *An. stephensi*.

Para comparação da eficiência dos tecidos a testar com produtos similares que existem no mercado, adquiriu-se uma t-shirt da conhecida marca *Petit Patapon*[®] para testar a eficácia da repelência desta em relação à espécie *An. stephensi*. A composição do composto utilizado no tratamento do tecido e seu modo de incorporação no têxtil são desconhecidos. O tecido foi utilizado sem ser submetido a qualquer lavagem. Todos os ensaios decorrem em sistema túnel descrito em **III.1.4**. Para os ensaios foram seleccionadas 100 mosquitos fêmeas não alimentadas, quer para o tratado (malha impregnada) e para o controlo (sem tratamento). No caso do tecido controlo seleccionou-se um com cor e textura mais semelhante ao tratado. Cada tecido foi devidamente colocado a separar os compartimentos e contabilizados os números de mosquitos que passavam ao longo dos diferentes tempos (5, 10, 20, 40, 60 e 120 minutos). Para o mesmo tecido efectuou-se uma série de três ensaios. Através do número de fêmeas recolhidas no final de cada ensaio, calculou-se os parâmetros de redução de refeição sanguínea (BFI) e o índice de repelência (IRE) (ver ponto **III.1.6**).

III.1.6. Cálculo dos índices de repelência e de redução da refeição sanguínea. Tratamento estatístico dos resultados.

A redução de refeição sanguínea (BFI) avaliou-se pela comparação da proporção de fêmeas alimentadas nos túneis-controlo e tratado, no final do ensaio. Para cada tratamento, a taxa de redução de refeição sanguínea (BFI) foi calculada pela seguinte fórmula (Pennetier *et al.*, 2007):

$$BFI = 100 - \frac{\text{tratado}^{\circ} \times 100}{\text{controlo}^{\blacksquare}} \quad \text{Equação 1}$$

Legenda: [°]Tratado representa a proporção de fêmeas alimentadas colectadas do compartimento B no túnel com tecido impregnado. [■]Controlo representa a proporção de fêmeas alimentadas colhidas do compartimento B no túnel com tecido sem impregnação (controlo).

O índice de repelência (IRE) corresponde à comparação da proporção de fêmeas que passaram para o compartimento B nos túneis-controlo e tratado, após interrupção dos testes. Para cada tratamento, o índice de repelência (IRE) foi calculado pela seguinte fórmula adaptada de Pennetier *et al.* (2007):

$$IRE = 100 - \frac{tratado^{\circ} \times 100}{controlo^{\blacksquare}} \quad \text{Equação 2}$$

Legenda: $^{\circ}$ Tratado representa a proporção de fêmeas que atingiram o compartimento B no túnel com tecido impregnado. $^{\blacksquare}$ Controlo representa a proporção de fêmeas que atingiram o compartimento B no túnel com tecido sem impregnação (controlo).

A significância estatística da diferença observada entre o número de fêmeas presentes/alimentadas no compartimento B do túnel-teste e do respectivo túnel-controlo foi determinada através de um teste χ^2 , tal como descrita em Pennetier *et al.* (2007). Para efectuar este teste recorreu-se à ferramenta informática, disponível em <http://people.ku.edu/~preacher/chisq/chisq.htm>.

III.2. Avaliação em ensaios de campo do efeito de repelência de tecidos tratados com insecticidas/repelentes seleccionados com base nos resultados laboratoriais.

III.2.1. Área de Estudo.

Os estudos de repelência foram realizados na área da Comporta (38°22'41.93"N; 8°47'14.93"O), freguesia portuguesa do Concelho de Alcácer do Sal, situada na região do Alto Alentejo, com 112 km² de área e aproximadamente 1500 habitantes (INE¹, 2001). Caracteriza-se por ser uma zona costeira, localizada entre a margem sul do estuário Sado e o Oceano Atlântico (**Figura III.1**). Apresenta diferentes tipos de habitats e várias potenciais áreas para a criação de mosquitos, e.g. pântanos (Ramos *et al.*, 2001, não publicado). É uma zona rural, onde o cultivo do arroz é a principal actividade agrícola (INE¹, 2003).

¹ Instituto Nacional de Estatística: <http://www.ine.pt> (acedido em 29 de Setembro de 2010).

A região da Comporta é uma zona de baixa altitude, que varia entre o nível do mar e os 60 metros. A oeste, em paralelo com a estrada e as habitações locais, existe uma vasta extensão de campos de arroz. A norte e a noroeste da área de estudo há uma paisagem protegida nacional (RNES²). Este local possui zonas pantanosas, cerca de 600 hectares de campos de arroz e algumas salinas abandonadas (Ramos *et al.*, 2001, não publicado).

A característica mais saliente do clima regional é a nítida influência mediterrânica, traduzida por um Verão pronunciado e seco e um Inverno relativamente ameno. A média mensal das temperaturas diárias oscila ao longo do ano entre os 10°C e 21°C. A precipitação concentra-se principalmente nos meses frios de Inverno e rareia na Primavera/Verão (Programa de Desenvolvimento Agrícola Regional, 1990)³.

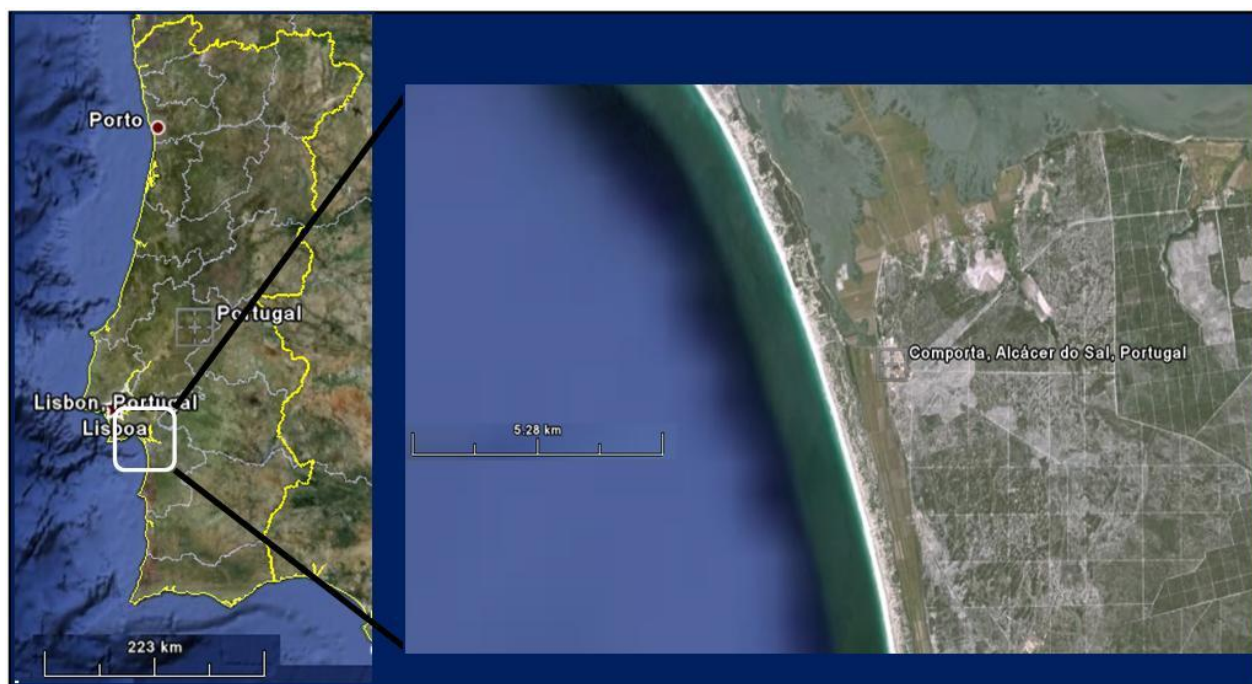


Figura III.1. Localização geográfica da área de estudo.

Imagem adaptada de Google Earth (@2010 Google TM), acedido em 28 de Dezembro de 2010.

² RNES: Reserva Natural do Estuário do Sado (acedido em 29 de Setembro de 2010).

³ http://agricultura.isa.utl.pt/dpaa/resultado_descritivo_2.aspx?id_publicacao=913&uni=4 (acedido em 29 de Setembro de 2010).

III.2.2. Voluntários humanos.

Foram seleccionados cinco voluntários saudáveis para o ensaio. Cada colheita diária foi efectuada por grupos de quatro voluntários diferentes (designados de 1, 2, 3 e 4), dos quais apenas três dos voluntários efectuaram a totalidade de dias de captura de culicídeos. Durante a experiência, os sujeitos permaneceram sentados, cada um envergando uma peça de vestuário de tecido tratado ou tecido controlo, idêntico ao anterior mas sem o composto activo. Os voluntários actuaram simultaneamente como isco e colector. De acordo com as condições específicas de cada ensaio, cada um dos elementos protegeu-se com o vestuário adequado para minimizar as picadas de mosquitos (*i.e.* no rosto com redes mosquiteiras e luvas de látex para as mãos).

III.2.3. Metodologia dos ensaios de campo efectuados

Durante o trabalho de campo foram efectuados dois tipos de ensaios:

Ensaio A: Com os quais se pretendeu avaliar o efeito da impregnação no número de mosquitos fêmeas que pousavam sobre peças de vestuário (perneiras), confeccionadas com tecidos tratados.

Ensaio B: Em que se avaliou o efeito de repelência de uma peça de vestuário tratada (t-shirt) sobre o número de mosquitos, que tentam picar os humanos em zonas expostas e não protegidas por tecido tratado.

Os ensaios na Comporta decorreram na época seca no período de 7 a 12 de Agosto de 2010, no âmbito do projecto TINAMAR. A colheita de mosquitos teve uma duração de três horas, das 20h00 às 23h00.

Nos **ensaios A**, cada um dos voluntários envergou um par de perneiras tratadas ou perneiras controlo (idênticas às impregnadas mas sem produto). Utilizando um aspirador de mosquitos eléctrico e uma lanterna, cada voluntário capturou os mosquitos que pousaram sobre as respectivas

perneiras. Nos **ensaios B**, os iscos/colectores vestiram t-shirts impregnadas ou t-shirts controlo e protegeram-se contra a picada de mosquitos com vestuário adequado, à excepção dos membros inferiores que permaneceram descobertos durante todos os períodos de captura. Cada voluntário capturou os mosquitos que pousaram nos seus membros inferiores expostos, com o auxílio de um aspirador e de uma lanterna.

Inicialmente cada um dos elementos colocou-se em uma de quatro posições disponíveis ao longo do campo, distanciados cerca de 5 m um dos outros, e envergando uma peça de vestuário de tecido tratado com diferentes lavagens (zero, 25 e 50) ou o tecido controlo (com textura e cor semelhante, mas sem composto activo). Antes do início da colheita os voluntários friccionaram o tecido tratado ou controlo cerca de 10 vezes, quer para a t-shirt quer para o par de perneiras. A cada 15 minutos todos os iscos/colectores mudavam simultaneamente de posição segundo o esquema abaixo apresentado (**Figura III.2**). Assim, ao final de cada hora de colheita todos os voluntários tinham estado em todas as posições de colheita. Nesta altura e sempre que o voluntário regressava à sua posição inicial, trocava de tubo de colheita registando neste o seu nome, período de colheita, tipo de peça de vestuário que envergava, e tipo de tratamento/lavagem ou controlo do tecido de que era confeccionada o vestuário a testar. Os ensaios A e B foram efectuados em dias alternados, numa sequência de seis noites de colheita. Em cada dia, cada isco/colector envergava uma t-shirt/perneiras diferente mas iniciava o ensaio sempre na mesma posição de captura.

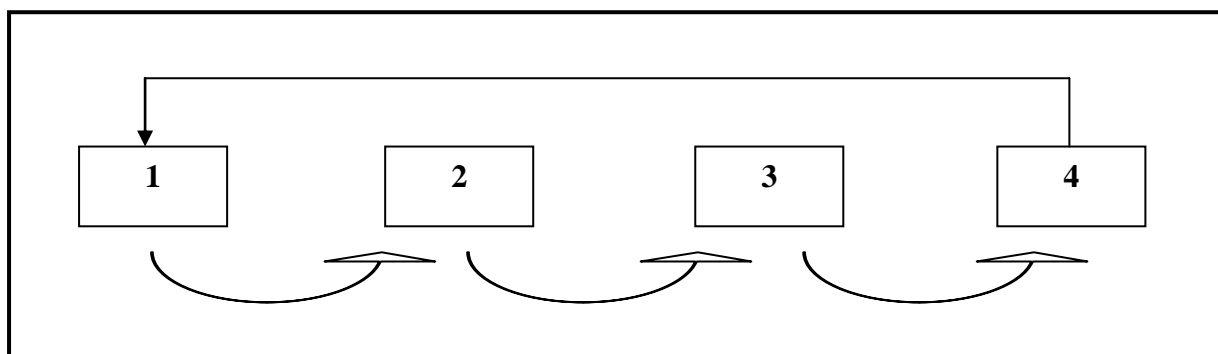


Figura III.2. Esquema representativo da mudança de posição de cada voluntário, quer com perneiras ou t-shirts.
Legenda: Os números 1, 2, 3 e 4 representam cada voluntário; as setas indicam o sentido a que foi efectuada a mudança.

III.2.4. Análise e tratamento dos resultados.

Os mosquitos capturados foram mantidos em contentores separados por dia, hora e por colector. Foram transportados para o laboratório, separados segundo o sexo e identificados até ao nível de espécie, ao estereomicroscópio (Olympus modelo SZ-30, EUA), de acordo a chave de identificação de Ribeiro & Ramos (1999). Na análise dos resultados utilizaram-se os programas Microsoft Excel[®] 2007 e SPSS para Windows[®], versão 18. Os resultados foram analisados com recurso a estatística não paramétrica através da aplicação do teste de Friedman e do teste emparelhado de Wilcoxon.

III.3. Efeito de repelência dos tecidos seleccionados em relação à espécie mais abundante na região da Comporta.

Para melhor compreensão e comparação dos resultados obtidos nos ensaios laboratoriais com a espécie *Anopheles stephensi* e nos ensaios de campo, foi efectuado uma segunda ronda de ensaios laboratoriais desta vez utilizando como modelo invertebrado a espécie *Culex theileri*. Os exemplares utilizados nestes ensaios foram criados e gentilmente cedidos pela Professora Teresa Novo, responsável pela manutenção da colónia *Cx. theileri*. No caso desta espécie, testou-se apenas os tecidos tratados com o mesmo produto activo, da mesma cor e com o mesmo número de lavagens (excepto as 50 lavagens) daqueles utilizados no trabalho de campo na Comporta (ver ponto **III.2.3.**). A metodologia usada foi o sistema túnel descrito em **III.1.4.** No caso das fêmeas desta espécie, dois dias antes dos ensaios optou-se por retirar a solução açucarada da gaiola cúbica, de forma a garantir que as fêmeas fizessem uma refeição sanguínea adequada. Para o mesmo tecido efectuou-se o maior número de ensaios possíveis às diferentes lavagens e calculou-se os índices de repelência e a redução da refeição sanguínea (ver ponto **III.1.4.**) de acordo com as equações já apresentadas. O tratamento estatístico foi idêntico ao descrito no ponto **III.2.4.**

IV. RESULTADOS

IV.1. Avaliação do efeito de repelência, em condições laboratoriais, de tecidos de algodão tratados com três compostos diferentes: permetrina, DEET e citronela.

IV.1.1. Resultados dos ensaios de túnel.

Os três tipos de tecidos foram testados pelo sistema túnel adaptado de Pennetier *et al.*, 2007, durante 120 minutos, tendo sido expostos a fêmeas da espécie *Anopheles stephensi* Liston, 1991 na presença de um isco mamífero. Cada tecido ensaiado foi utilizado pelo menos três vezes. Os compostos foram incorporados no tecido de algodão por técnicas de impregnação (no caso da permetrina) ou por tecnologia de micro-encapsulação (no caso do DEET e citronela). As amostras testadas incluíram tecidos tratados sem lavagens e tecidos sujeitos a diversos ciclos de lavagem.

Em todos os ensaios efectuados a taxa de mortalidade foi sempre nula, mesmo no caso dos tecidos impregnados com permetrina, o único composto testado com comprovado efeito insecticida.

Os resultados obtidos na exposição dos insectos ao tecido impregnado com permetrina, sem e com vários ciclos de lavagens (5, 15, 25, 50 e 60), está representado na **Figura IV.1**. Como se pode observar nesta figura, a percentagem de fêmeas que atingiram o compartimento B dos túneis-controlo foi sempre superior à percentagem de culicídeos que passaram para os compartimentos do isco, dos túneis-teste. Quando se compara, uma a uma, a proporção de fêmeas que passaram no controlo e no correspondente ensaio, esta diferença foi ainda mais marcante, podendo ser verificada em todos os tempos de observação à excepção do ensaio 1 do tecido lavado 25 vezes (**Figura IV.1D; Anexo I**). Neste caso particular, durante os primeiros 10 minutos do ensaio a proporção de fêmeas no compartimento B do túnel controlo foi inferior à proporção registada no tubo teste. Quanto à dinâmica de actividade dos insectos ao longo dos 120 minutos, de uma forma geral, observou-se uma maior percentagem de passagem de mosquitos durante os primeiros 20 minutos, percentagem essa que foi diminuindo até ao final do ensaio. Aos 120 minutos a percentagem de fêmeas nos compartimentos B em pouco se alterou em comparação com o valor registado aos 60

minutos. Este padrão de actividade foi observado quer nos diferentes controlos quer nos respectivos túneis-teste.

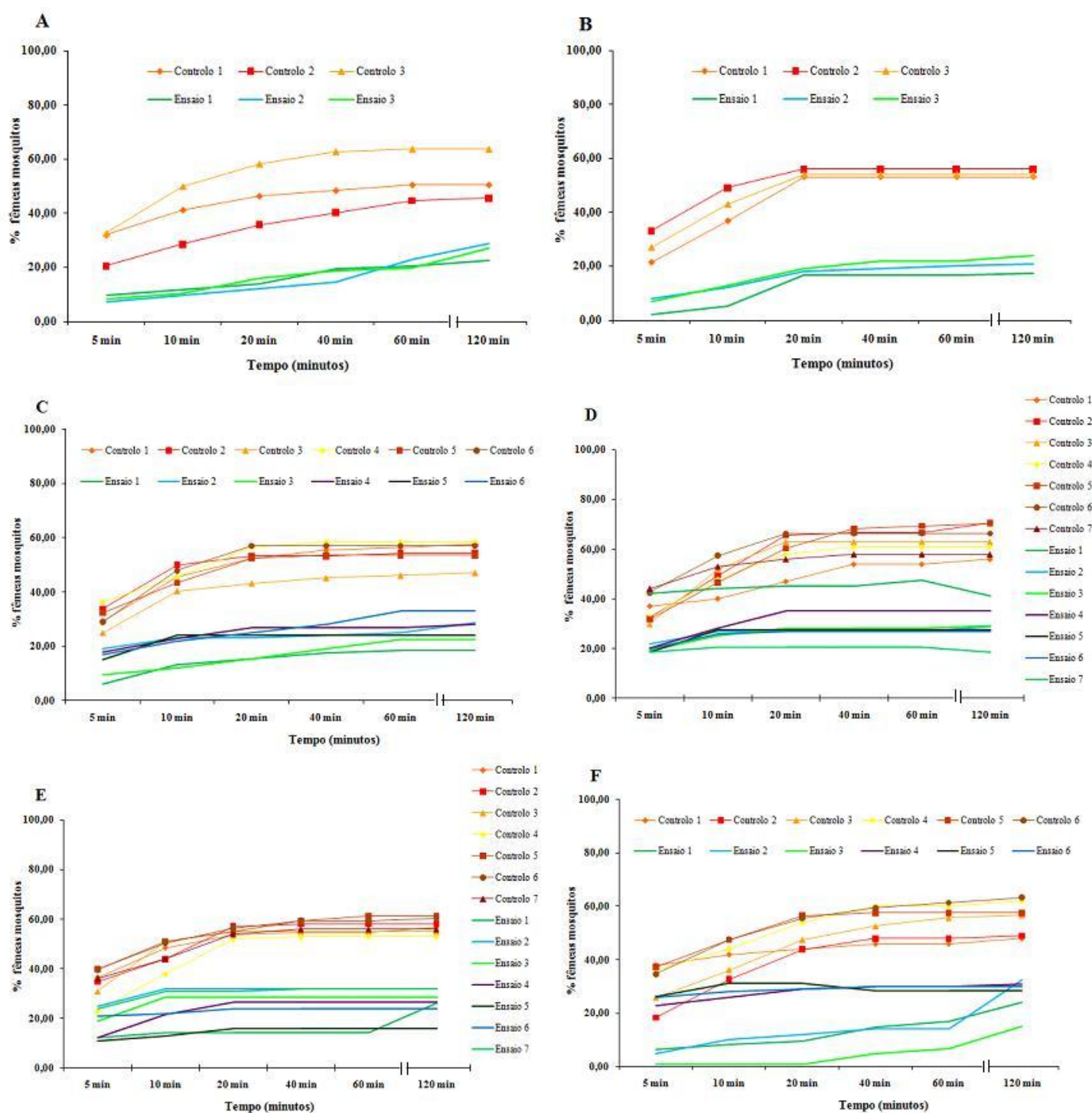


Figura IV.1. Efeito da repelência nos mosquitos fêmeas *Anopheles stephensi* quando expostas ao tecido impregnado com permectrina em comparação com o seu respectivo controlo. (A) Tecido com zero lavagens; (B) Tecido com 5 lavagens; (C) Tecido com 15 lavagens; (D) Tecido com 25 lavagens; (E) Tecido com 50 lavagens e (F) Tecido com 60 lavagens.

Comparando os ensaios dos tecidos com diferentes número de lavagens pode-se afirmar que, de um modo geral e sem nenhuma inferência estatística, os tecidos lavados 25 e 60 vezes foram aqueles que apresentaram resultados menos consistentes, *i.e.*: o intervalo referente aos valores mínimo e máximo das diferenças observadas na percentagem de fêmeas que atingiram os compartimentos B (controlo e teste) foi superior (**Anexo I**) e as curvas referentes à dinâmica de actividade de passagem são menos homogêneas dentro de cada grupo (grupo das curvas controlo vs grupo das curvas teste) e menos diferenciadas em relação ao grupo oposto.

As experiências de repelência realizadas com o produto DEET (formulação original) encontram-se representadas na **Figura IV.2**. Os resultados dos ensaios com tecidos com microcápsulas de DEET e sem terem sido submetidos a lavagem apresentaram discrepâncias: por um lado, em dois dos ensaios (ensaios 1 e 2) os tecidos pareceram ter induzido repelência nos mosquitos fêmeas e, por outro, em outros dois ensaios (3 e 4) a percentagem de fêmeas que atingiram o compartimento B foi superior no túnel-teste em comparação com o túnel-controlo (**Anexo I**). Relativamente aos tecidos com 5, 10 e 15 lavagens (**Figura IV.2B, 2C e 2D**, respectivamente), os valores das percentagens finais de fêmeas que atingiram os compartimentos B dos túneis de controlo nem sempre foram superiores àqueles registados para os túneis-teste. Do mesmo modo, não se verificou uma redução acentuada, na percentagem de mosquitos fêmeas presentes no compartimento do isco nos túneis-teste em comparação aos seus controlos correspondentes (**Anexo I**). No entanto, nesta comparação emparelhada, e ao contrário do que aconteceu nos tecidos não lavados, a percentagem de fêmeas no compartimento do túnel-teste nunca foi superior à sua homóloga no túnel-controlo (**Anexo I**).

No caso dos tecidos submetidos a 20 lavagens (**Figura IV.2E**), e contra todas as expectativas, independente do ensaio em causa, as percentagens de fêmeas presentes no compartimento B do túneis-controlo foi, a cada tempo de observação, sempre superior àquelas observadas no tubos teste. Quando aos padrões de actividade observados em ensaios com tecidos tratados com DEET (sem e com lavagens) estes, embora não tão bem definidos, foram semelhantes

aos observados com amostras impregnadas com permetrina. Assim, a maior parte das fêmeas transita para os compartimentos do isco (quer nos túneis-teste, quer controle) durante os primeiros 20 minutos do ensaio, observando-se poucas alterações na percentagem de fêmeas presentes no compartimento B após os 60 minutos de experiência.

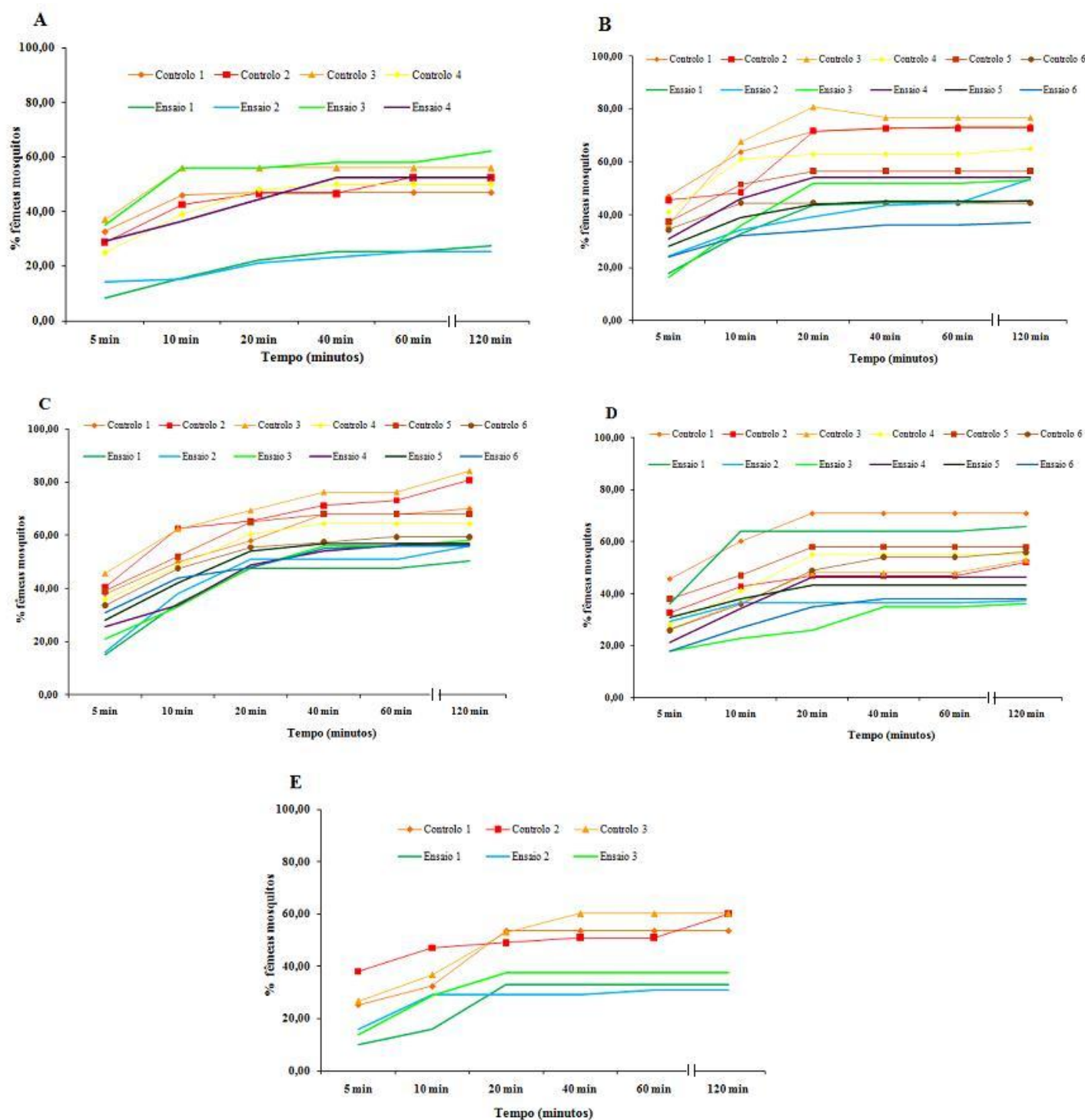


Figura IV.2. Efeito da repelência nos mosquitos fêmeas *Anopheles stephensi* quando expostas ao tecido com DEET microcapsulado (formulação original) em comparação com o seu respectivo controle. (A) Tecido com zero lavagens; (B) Tecido com 5 lavagens; (C) Tecido com 10 lavagens; (D) Tecido com 15 lavagens e (E) Tecido com 20 lavagens.

Testou-se mais dois tecidos tratados com DEET designados de DEET n.º2 e n.º3 (**Figura IV.3**). Os tecidos com microcápsulas de DEET n.º2, sem lavagens ou sujeitos a 10 lavagens, parecem exercer efeito de repelência sobre as fêmeas de *An. stephensi* visto que, para todos os ensaios e para qualquer dos tempos de observação, a percentagem de fêmeas que transitaram para os compartimentos B dos túneis de teste foi sempre inferior àquelas observadas no tubo de controlo. Relativamente ao DEET n.º 3, apenas se efectuou testes para as zero lavagens (**Figura IV.3C**). Os resultados apresentam algumas disparidades relevantes entre si. Nos ensaios 2 e 6 a percentagem de fêmeas que transitaram para os compartimentos B dos túneis-testes foram idênticos ou muito semelhantes à percentagem observada nos respectivos controlos; nos ensaios 1, 3, 4 e 5, a proporção de fêmeas que passam de um lado oposto ao ponto de libertação, foi claramente superior nos túneis-controlo em comparação com os respectivos túneis-teste.

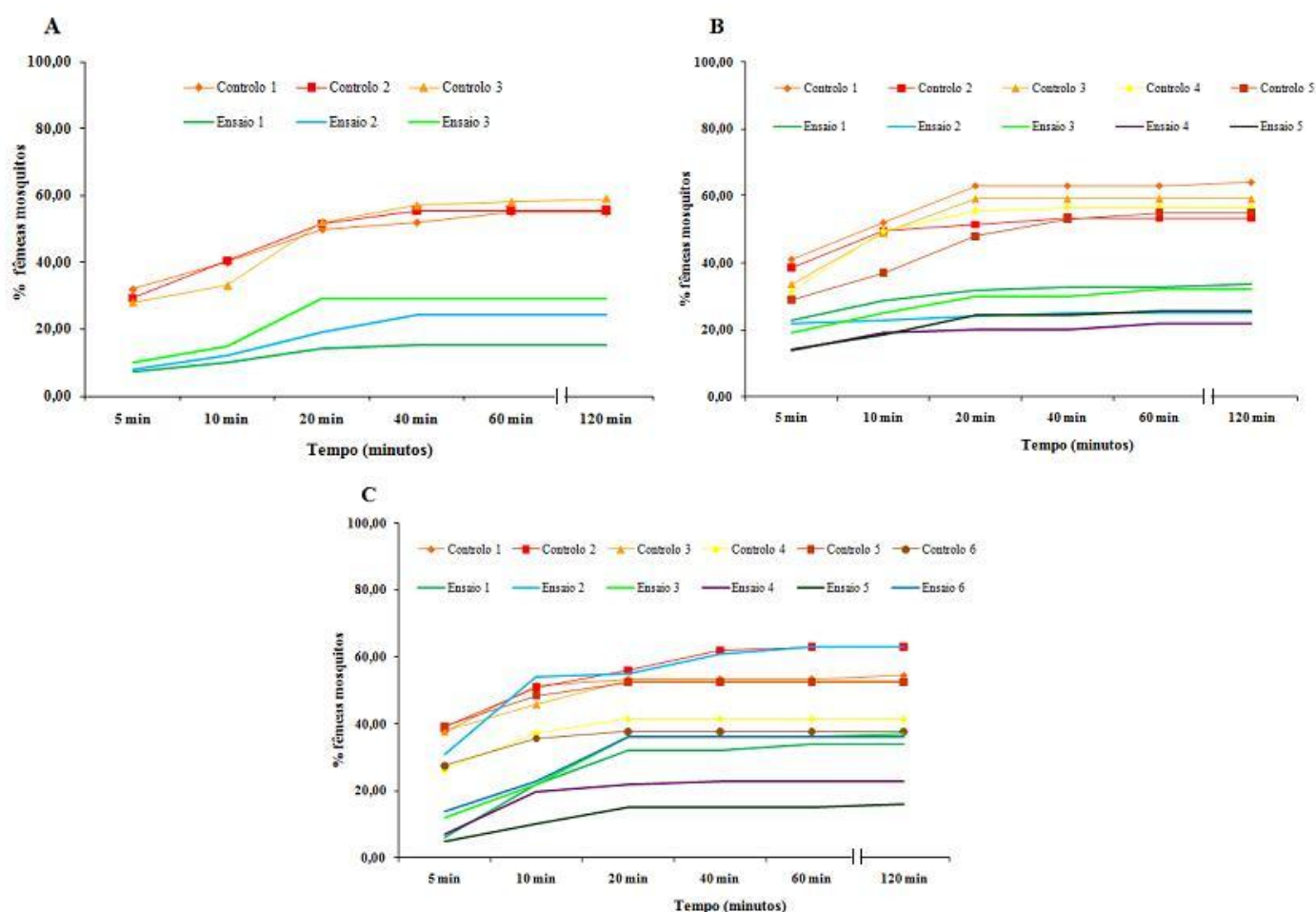
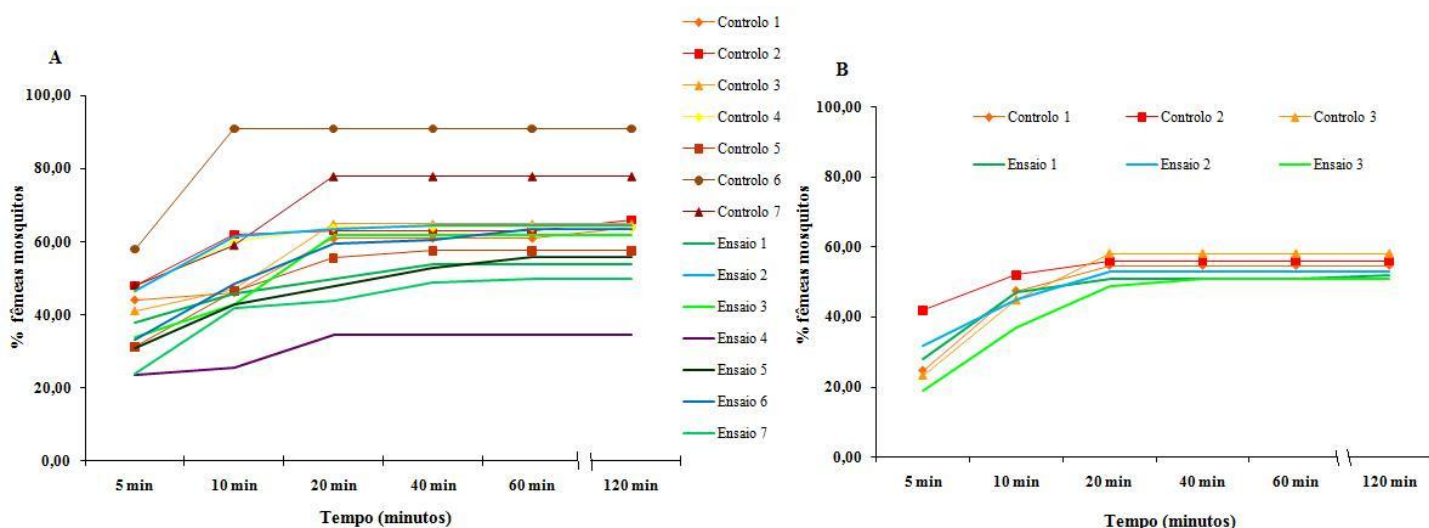


Figura IV.3. Efeito da repelência nos mosquitos fêmeas *Anopheles stephensi* quando expostas ao tecido com DEET microcapsulado n.º 2 (A) e (B), respectivamente e DEET microcapsulado n.º 3 (C), em comparação com o seu controlo correspondente. (A) Tecido com DEET n.º 2 e zero lavagens; (B) Tecido com DEET n.º 2 e 5 lavagens e (C) Tecido com DEET n.º 3 e zero lavagens.

Os padrões de actividade de passagem são semelhantes aos observados anteriormente, com a maior parte das fêmeas a transitar para os compartimentos B durante os primeiros 20 minutos das experiências.

Por último foram testados tecidos tratados com um repelente natural, micro-encapsulado, a citronela, sem lavagens ou sujeitos a 5 ciclos de lavagens (**Figura IV.4**). Para os tecidos sem lavagens, embora as percentagens de fêmeas presentes, no final de cada ensaio, nos compartimentos do isco tenham sido sempre superiores nos túneis de controlo em comparação com as percentagens homólogas nos túneis-teste, as diferenças observadas foram frequentemente mínimas (**Anexo I**). Para tecidos sujeitos a 5 lavagens (**Figura IV.4B**), pode-se averiguar um comportamento semelhante na proporção de fêmeas mobilizadas nos diferentes ensaios, em comparação com o seu respectivo controlo. O padrão com que ocorreu a passagem das fêmeas do compartimento A para o B foi semelhante aos anteriormente observados.



Na **Figura IV.5** encontram-se representadas as percentagens médias (e respectivos valores de desvio padrão) das fêmeas que transitaram dos compartimentos A para B aos diferentes tempos contabilizados (5, 10, 20, 40, 60 e 120 minutos). Apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios com tecidos impregnados com permetrina (sem lavagens e com 5, 25 e 50 lavagens), com tecidos

com DEET micro-encapsulado (formulação original) e com citronela. Em relação a estes dois últimos tipos de tecidos, apenas se apresenta os resultados referentes às lavagens zero e 5 visto serem as únicas possíveis de comparar entre todos os tecidos testados. Os resultados com base nos quais foram elaborados os gráficos encontram-se discriminados no **Anexo II**. Para o caso da permetrina (**Figura IV.5A, B, C e D**), o efeito de repelência foi mantido durante os 120 minutos de exposição, sendo que a média de mosquitos que passam inicialmente (entre os 5 e 10 minutos) para o compartimento B, na presença do tecido tratado e sujeito a 25 e 50 lavagens, foi semelhante à percentagem obtida no final do ensaio. Como seria expectável o efeito de repelência foi mais visível nas zero e 5 lavagens (**Figura IV.5A e B**, respectivamente), do que nas 25 e 50 lavagens (**Figura IV.5C e D**, respectivamente). Relativamente ao DEET, embora as percentagens médias de mosquitos que atravessaram o tecido com zero lavagens nos túneis-controlo sejam, ao longo do período de experiência (**Figura IV.5E**), ligeiramente superiores às registadas nos aparatos de teste, os desvios padrões associados a estas médias são bastantes elevados e sobreponíveis aos obtidos na análise dos resultados dos túneis-controlo. Entre a exposição inicial ao produto (5 a 10 minutos) e a final (120 minutos), não existe uma diferença visualmente significativa na percentagem média de mosquitos anofelíneos, que passaram para o compartimento B, em relação ao controlo. No caso das 5 lavagens (**Figura IV.5F**), existe alguma diferença entre a percentagem média de mosquitos que passam para o compartimento B, na presença do tecido tratado em comparação com o controlo. Esta diferença é mais evidente nos primeiros 10 minutos de exposição. Os valores do desvio padrão são menores em comparação aos estimados na análise dos resultados obtidos com zero lavagens mas, ainda assim, sobreponíveis aos valores calculados para os aparatos-controlo, para os tempos de observação superiores a 20 minutos. Este facto poderá ser indicativo da existência de uma situação de repelência não efectiva após este período de tempo. Na presença do repelente natural, citronela, para as zero e 5 lavagens (**Figura IV.5G e H**), não foi observado nenhum efeito de repelência sobre os mosquitos testados. Para os tecidos não lavados existe uma diferença numérica na percentagem média de fêmeas que passam para o compartimento B, entre o

tecido tratado com citronela e o tecido controlo, mas, tal como para o DEET, ocorre sobreposição dos intervalos definidos pelos valores dos respectivos desvios padrões.

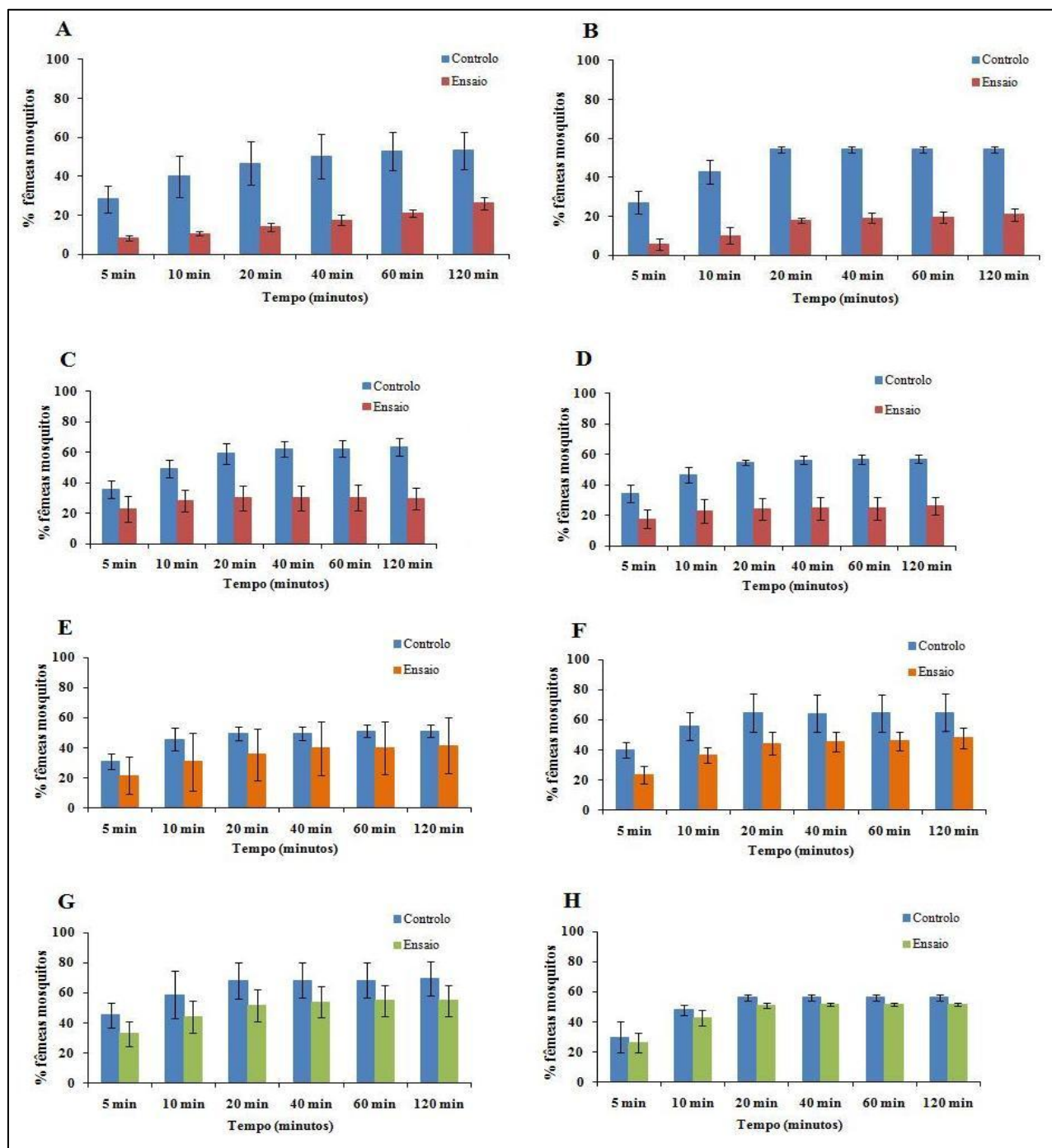


Figura IV.5. Percentagem média de mosquitos fêmeas *Anopheles stephensi* que tentaram picar e/ou alimentar-se, quando expostas ao tecido impregnado em comparação com o seu respectivo controlo, durante 120 minutos. (A) Tecido com permetrina e sem lavagens; (B) Tecido com permetrina e com 5 lavagens; (C) Tecido com permetrina e com 25 lavagens; (D) Tecido com permetrina e com 50 lavagens; (E) Tecido com DEET e sem lavagens; (F) Tecido com DEET e com 5 lavagens; (G) Tecido com citronela e sem lavagens e (H) Tecido com citronela e com 5 lavagens.

A percentagem de fêmeas que efectivamente se alimentaram no hospedeiro é apresentada na

Figura IV.6. Os resultados encontram-se representados pela média \pm desvio padrão. Foram efectuadas três tipos de comparação: (i) entre tecidos tratados com os três produtos iniciais

(permetrina, DEET e citronela), e não sujeitos a lavagens ou submetidos a 5 lavagens; (ii) entre diferentes tipos de DEET (formulação original e DEET n.º 2 e DEET n.º 3) e; (iii) entre a permetrina e a formulação de DEET mais eficaz em tecidos com zero e 5 lavagens. Através das **Figuras IV.6A e B** (zero e 5 lavagens, respectivamente), é notória a diferença entre a média de mosquitos fêmeas que se alimentaram na presença do insecticida permetrina ($3.71\% \pm 2.42$ e $8.84\% \pm 7.54$, respectivamente) e o tecido controlo ($45.83\% \pm 5.39$ e $32.22\% \pm 1.35$, respectivamente), evidenciando, assim, o seu efeito na inibição das picadas dos anofelíneos testados. Pelo contrário, as percentagens médias de fêmeas que se alimentaram no hospedeiro aquando da presença dos repelentes DEET ($28.81\% \pm 19.68$ e $36.67\% \pm 8.56$, zero e 5 lavagens, respectivamente) e citronela ($24.08\% \pm 9.73$ e $36.33\% \pm 3.06$, zero e 5 lavagens, respectivamente) não apresentaram diferenças numericamente relevantes em relação àquelas que ocorreram com tecido não tratado ($36.54\% \pm 7.32$ e $54.49\% \pm 13.52$, DEET, zero e 5 lavagens; $35.43\% \pm 14.71$ e $40.32\% \pm 1.48$, citronela, zero e 5 lavagens, respectivamente). Este facto foi mais evidente para o caso do repelente citronela às 5 lavagens ($36.33\% \pm 3.06$), em que praticamente não existiu dissemelhança relativamente ao tecido controlo ($40.32\% \pm 1.48$) (**Figura IV.6B**).

Pela análise da percentagem média de fêmeas que se alimentaram no hospedeiro, na presença dos diferentes tipos de DEET (**Figura IV.6C**), pode-se dizer que existe uma diferença clara entre os três. Na presença de tecidos com DEET n.º 2 micro-encapsulado ($10.08\% \pm 3.55$), a média de fêmeas que se alimentaram no isco usado foi bastante inferior em relação ao tecido não tratado ($35.12\% \pm 1.85$). Tal o não ocorreu na presença de tecidos tratados com as outras formulações de DEET. Deste modo, o DEET n.º 2 ($10.08\% \pm 3.55$) mostrou sinais de inibir a apetência dos mosquitos fêmeas para efectuar uma refeição sanguínea. As formulações designadas de original ($28.81\% \pm 19.68$) e DEET n.º 3 ($25.66\% \pm 14.48$), apresentaram percentagens médias de fêmeas alimentadas superiores às obtidas com DEET n.º 2 e os valores dos desvios padrões associados a estas médias são sobreponíveis aos obtidos para os túneis-controlo. Uma vez que o DEET n.º 2 apresentou um efeito evidente na média de fêmeas que realizaram refeição sanguínea,

comparou-se a sua eficácia com o insecticida permetrina. Pela comparação entre os resultados obtidos com tecidos tratados com DEET n.º 2, com zero ($10.08\% \pm 3.55$) e 5 lavagens, ($21.21\% \pm 5.37$) (**Figura IV.6D e E**, respectivamente), e o tecido tratado com permetrina para as mesmas lavagens ($3.71\% \pm 2.42$ e $8.84\% \pm 7.54$, respectivamente), pode-se afirmar que o tecido tratado com o repelente, apesar de apresentar percentagens médias superiores, apresenta propriedades de inibição da realização de refeição sanguínea nos anofelíneos com níveis de eficácia consideráveis.

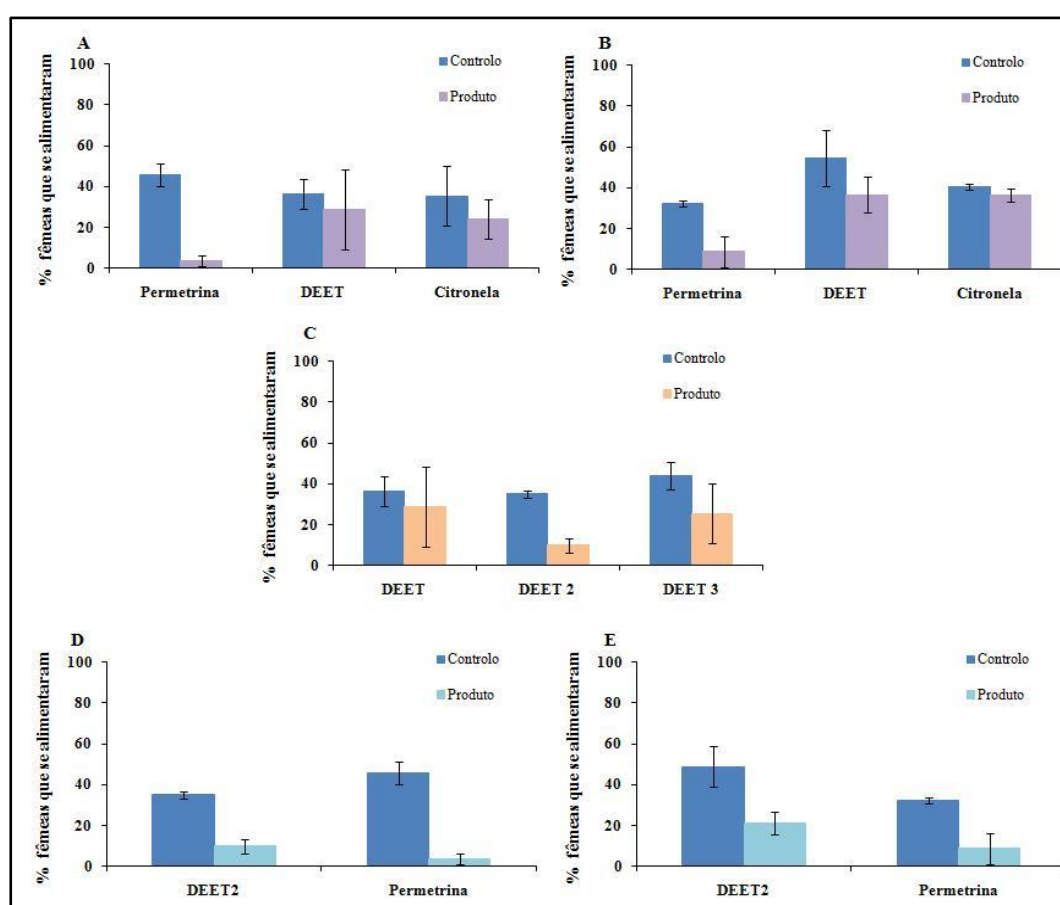


Figura IV.6. Percentagem média de mosquitos fêmeas *Anopheles stephensi* que efectivamente se alimentaram no hospedeiro, quando expostas aos diferentes tecidos tratados (Permetrina, DEET e citronela) e em relação aos respectivos controlos. (A) Comparação entre os três tecidos tratados a zero lavagens; (B) Comparação entre os três tecidos tratados a 5 lavagens; (C) Comparação entre os diferentes tipos de tecidos tratados com DEET e sem lavagens; (D) Comparação entre o tecido com DEET n.º 2 e tecidos com permetrina a zero lavagens e (E) Comparação entre o tecido tratado com DEET n.º 2 e tecidos com permetrina a 5 lavagens.

IV.1.2. Estimativa da eficácia da repelência dos diferentes tecidos, sem e com diferente número de lavagens, para *An. stephensi* Liston através do cálculo dos índices de repelência (IRE) e a redução da refeição sanguínea (BFI).

O cálculo da redução da refeição sanguínea (BFI) dos índices de repelência (IRE) foi efectuado de acordo com as equações 1 e 2, respectivamente. As estimativas destes índices para os

diferentes tecidos (permetrina, as três formulações de DEET e citronela), assim como a análise estatística dos resultados encontram-se representados nas tabelas seguintes.

Para os ensaios efectuados com tecidos impregnados com permetrina, apesar dos índices de repelências apresentarem frequentemente valores muito próximo ou mesmo acima de 50, em alguns ensaios não se observou diferenças estatisticamente significativas entre o número de fêmeas recolhidas dos compartimentos B do aparato-teste em comparação com o túnel-controlo. Este facto ocorreu em três dos ensaios: (i) ensaio 2 dos tecidos sem lavagens ($P = 0.136$); (ii) ensaio 1 dos tecidos com 25 lavagens ($P = 0.076$) e; (iii) ensaio 2 dos com 60 lavagens ($P = 0.025$). No entanto, para todos os tecidos impregnados com permetrina, e independentemente do número de lavagens a que estes foram submetidos, os valores de BFI estimados foram sempre muito elevados. Em todos os ensaios efectuados, ocorreu um efeito expressivo na inibição das refeições sanguíneas, com uma redução estatisticamente significativa do número de fêmeas alimentadas no aparato-teste em comparação com o número de insectos ingurgitados nos túneis-controlo (**Tabela IV.1**).

Na **Tabela IV.2** estão apresentados os valores de IRE e BFI estimados para os ensaios efectuados com tecidos com DEET micro-encapsulado (formulação original). Os valores obtidos são inferiores aos estimados para os tecidos impregnados com permetrina, só esporadicamente ultrapassando o valor 50. Comparando os índices calculados para diferentes ensaios efectuados com o mesmo tipo de tecido (*i.e.* igual número de lavagens) observam-se várias discrepâncias, incluindo a presença de índices negativos. Comparando os aparatos-teste e controlo no que se refere ao número de fêmeas recolhidas nos compartimentos B e destas, aquelas que se alimentaram, para tecidos com o mesmo número de lavagens, tanto se observou resultados estatisticamente semelhantes, como se rejeitou a hipótese nula. A única excepção ocorreu para o tecido com 15 lavagens, em que nunca se obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas entre os túneis-controlo e teste, no que se refere ao número de fêmeas recolhidas e ao número destas que se encontravam alimentadas.

Tabela IV.1. Resultados obtidos com permetrina contra mosquitos *An. stephensi*, para as diferentes lavagens.

Permetrina N.º Lavagem	N.º ensaio	IRE	Estatística		BFI	Estatística	
Zero lavagens	1	55,01	$\chi^2 = 15,586$	$P = 7,88 \times 10^{-5}$	88,41	$\chi^2 = 39,103$	$P < 0,001$
	2	23,94	$\chi^2 = 2,218$	$P = 0,136$	88,01	$\chi^2 = 29,829$	$P = 2,0 \times 10^{-8}$
	3	42,17	$\chi^2 = 12,174$	$P = 4,85 \times 10^{-4}$	98,16	$\chi^2 = 67,386$	$P < 0,001$
5 lavagens	1	66,97	$\chi^2 = 25,392$	$P = 4,7 \times 10^{-7}$	90,82	$\chi^2 = 5,847$	$P = 0,016$
	2	62,50	$\chi^2 = 24,411$	$P = 7,8 \times 10^{-7}$	87,50	$\chi^2 = 24,695$	$P = 6,7 \times 10^{-7}$
	3	55,56	$\chi^2 = 17,675$	$P = 2,62 \times 10^{-5}$	83,87	$\chi^2 = 21,172$	$P = 4,20 \times 10^{-6}$
15 lavagens	1	73,38	$\chi^2 = 49,858$	$P < 0,001$	84,43	$\chi^2 = 52,552$	$P < 0,001$
	2	43,13	$\chi^2 = 12,476$	$P = 4,12 \times 10^{-4}$	62,47	$\chi^2 = 12,245$	$P = 4,67 \times 10^{-4}$
	3	62,48	$\chi^2 = 27,862$	$P = 1,3 \times 10^{-7}$	86,54	$\chi^2 = 32,533$	$P = 1,0 \times 10^{-8}$
	4	53,80	$\chi^2 = 20,141$	$P = 7,29 \times 10^{-6}$	75,25	$\chi^2 = 22,856$	$P = 1,75 \times 10^{-6}$
	5	55,00	$\chi^2 = 18,071$	$P = 2,13 \times 10^{-5}$	76,71	$\chi^2 = 19,182$	$P = 1,19 \times 10^{-5}$
	6	41,38	$\chi^2 = 10,648$	$P = 0,001$	67,57	$\chi^2 = 15,570$	$P = 7,95 \times 10^{-5}$
25 lavagens	1	23,28	$\chi^2 = 3,155$	$P = 0,076$	59,69	$\chi^2 = 16,013$	$P = 6,29 \times 10^{-5}$
	2	57,38	$\chi^2 = 33,040$	$P = 1,0 \times 10^{-8}$	71,26	$\chi^2 = 39,377$	$P < 0,001$
	3	54,93	$\chi^2 = 24,037$	$P = 9,5 \times 10^{-7}$	60,02	$\chi^2 = 17,220$	$P = 3,33 \times 10^{-5}$
	4	44,76	$\chi^2 = 15,205$	$P = 9,645 \times 10^{-5}$	50,67	$\chi^2 = 9,849$	$P = 0,002$
	5	59,56	$\chi^2 = 33,932$	$P = 1,0 \times 10^{-8}$	44,78	$\chi^2 = 37,400$	$P < 0,001$
	6	59,90	$\chi^2 = 31,187$	$P = 2,0 \times 10^{-8}$	81,45	$\chi^2 = 36,318$	$P < 0,001$
	7	68,01	$\chi^2 = 30,685$	$P = 3,0 \times 10^{-8}$	76,21	$\chi^2 = 22,017$	$P = 2,7 \times 10^{-6}$
50 lavagens	1	51,79	$\chi^2 = 16,263$	$P = 5,51 \times 10^{-5}$	89,36	$\chi^2 = 43,841$	$P < 0,001$
	2	45,93	$\chi^2 = 13,676$	$P = 2,17 \times 10^{-4}$	63,89	$\chi^2 = 14,435$	$P = 1,45 \times 10^{-4}$
	3	47,89	$\chi^2 = 14,16$	$P = 1,68 \times 10^{-4}$	53,25	$\chi^2 = 8,548$	$P = 0,003$
	4	51,76	$\chi^2 = 15,438$	$P = 8,53 \times 10^{-5}$	55,78	$\chi^2 = 7,199$	$P = 0,007$
	5	72,51	$\chi^2 = 39,471$	$P < 0,001$	90,10	$\chi^2 = 48,800$	$P < 0,001$
	6	60,90	$\chi^2 = 27,184$	$P = 1,9 \times 10^{-7}$	63,79	$\chi^2 = 23,059$	$P = 1,57 \times 10^{-6}$
	7	42,86	$\chi^2 = 10,735$	$P = 0,001$	72,50	$\chi^2 = 20,634$	$P = 5,56 \times 10^{-6}$
60 lavagens	1	50,59	$\chi^2 = 11,812$	$P = 5,89 \times 10^{-4}$	80,09	$\chi^2 = 22,815$	$P = 1,78 \times 10^{-6}$
	2	34,01	$\chi^2 = 4,996$	$P = 0,025$	87,09	$\chi^2 = 16,219$	$P = 5,64 \times 10^{-5}$
	3	71,45	$\chi^2 = 34,328$	$P < 0,001$	100,00	N.A.	N.A.
	4	46,03	$\chi^2 = 15,694$	$P = 7,45 \times 10^{-5}$	45,83	$\chi^2 = 9,459$	$P = 0,002$
	5	52,54	$\chi^2 = 18,453$	$P = 1,74 \times 10^{-5}$	65,91	$\chi^2 = 18,928$	$P = 1,36 \times 10^{-5}$
	6	52,66	$\chi^2 = 21,151$	$P = 4,24 \times 10^{-6}$	65,04	$\chi^2 = 23,370$	$P = 1,34 \times 10^{-6}$

Legenda: a **negrito**, os resultados indicadores de diferença significativa superior a 99% de confiança. N.A.: Não aplicável; **IRE:** índice de repelência; **BFI:** redução de refeição sanguínea; χ^2 : teste qui-quadrado (correção de Yates) com g.L. = 1 para todos os resultados apresentados. **Estatística:** Análise estatística para comparação entre o número de fêmeas presentes/alimentadas que foram recolhidas nos compartimentos B do túnel-teste e respectivo túnel-controlo.

Tabela IV.2. Resultados obtidos com DEET contra mosquitos *An. stephensi*, para as diferentes lavagens.

DEET formulação original N.º Lavagem	N.º ensaio	IRE	Estatística		BFI	Estatística	
Zero lavagens	1	39,45	$\chi^2 = 6,268$	$P = \mathbf{0,012}$	40,49	$\chi^2 = 2,715$	$P = 0,099$
	2	52,77	$\chi^2 = 15,492$	$P = \mathbf{8,29 \times 10^{-5}}$	71,66	$\chi^2 = 17,004$	$P = \mathbf{3,73 \times 10^{-5}}$
	3	-8,47	$\chi^2 = 0,338$	$P = 0,561$	-26,19	$\chi^2 = 2,005$	$P = 0,157$
	4	-2,95	$\chi^2 = 0,006$	$P = 0,938$	13,42	$\chi^2 = 0,448$	$P = 0,503$
5 lavagens	1	37,05	$\chi^2 = 15,614$	$P = \mathbf{7,77 \times 10^{-5}}$	41,09	$\chi^2 = 10,957$	$P = \mathbf{9,33 \times 10^{-4}}$
	2	26,39	$\chi^2 = 7,030$	$P = \mathbf{0,008}$	23,64	$\chi^2 = 2,910$	$P = 0,088$
	3	31,01	$\chi^2 = 14,287$	$P = \mathbf{1,57 \times 10^{-4}}$	38,04	$\chi^2 = 16,067$	$P = \mathbf{6,11 \times 10^{-5}}$
	4	16,42	$\chi^2 = 2,112$	$P = 0,146$	22,22	$\chi^2 = 2,424$	$P = 0,120$
	5	18,07	$\chi^2 = 1,834$	$P = 0,176$	40,19	$\chi^2 = 7,162$	$P = 0,008$
	6	14,20	$\chi^2 = 0,606$	$P = 0,436$	27,21	$\chi^2 = 1,658$	$P = 0,198$
10 lavagens	1	26,41	$\chi^2 = 6,378$	$P = \mathbf{0,012}$	38,67	$\chi^2 = 8,565$	$P = \mathbf{0,003}$
	2	26,95	$\chi^2 = 10,511$	$P = \mathbf{0,001}$	16,43	$\chi^2 = 1,262$	$P = 0,261$
	3	33,04	$\chi^2 = 20,470$	$P = \mathbf{6,06 \times 10^{-6}}$	34,84	$\chi^2 = 8,359$	$P = \mathbf{0,004}$
	4	12,79	$\chi^2 = 1,086$	$P = 0,297$	31,98	$\chi^2 = 5,236$	$P = 0,022$
	5	18,31	$\chi^2 = 3,144$	$P = 0,076$	23,53	$\chi^2 = 2,444$	$P = 0,118$
	6	7,28	$\chi^2 = 0,239$	$P = 0,625$	10,74	$\chi^2 = 0,268$	$P = 0,605$
15 lavagens	1	6,88	$\chi^2 = 0,355$	$P = 0,551$	1,48	$\chi^2 = 0,302$	$P = 0,583$
	2	22,36	$\chi^2 = 2,235$	$P = 0,135$	31,47	$\chi^2 = 2,928$	$P = 0,087$
	3	32,15	$\chi^2 = 5,164$	$P = 0,023$	31,04	$\chi^2 = 1,578$	$P = 0,209$
	4	11,85	$\chi^2 = 0,605$	$P = 0,437$	19,71	$\chi^2 = 0,974$	$P = 0,324$
	5	26,12	$\chi^2 = 4,239$	$P = 0,040$	26,69	$\chi^2 = 2,500$	$P = 0,114$
	6	28,57	$\chi^2 = 4,507$	$P = 0,034$	34,78	$\chi^2 = 4,774$	$P = 0,029$
20 lavagens	1	38,36	$\chi^2 = 7,733$	$P = \mathbf{0,005}$	45,71	$\chi^2 = 4,814$	$P = 0,028$
	2	48,33	$\chi^2 = 15,808$	$P = \mathbf{7,01 \times 10^{-5}}$	58,82	$\chi^2 = 18,251$	$P = \mathbf{1,94 \times 10^{-5}}$
	3	37,51	$\chi^2 = 9,267$	$P = \mathbf{0,002}$	61,59	$\chi^2 = 18,941$	$P = \mathbf{1,35 \times 10^{-5}}$

Legenda: a **negrito**, os resultados indicadores de diferença significativa superior a 99% de confiança. **IRE:** índice de repelência; **BFI:** redução de refeição sanguínea; χ^2 : teste qui-quadrado (correção de Yates) com **g.I.** = 1 para todos os resultados apresentados. **Estatística:** Análise estatística para comparação entre o número de fêmeas presentes/alimentadas que foram recolhidas nos compartimentos B do túnel-teste e respectivo túnel-controlo.

Na **Tabela IV.3** encontram-se os resultados relativamente a tecidos com microcápsulas de DEET, de dois fornecedores diferentes. Os valores de IRE e BFI estimados para os ensaios em que se utilizaram tecidos tratados com DEET n.º 2 são sempre próximos de 50, ou superiores. O mesmo não se observa para os ensaios com DEET n.º 3, em que estes índices variam muito, apresentando, inclusive, valores negativos. O mesmo tipo de resultado ocorreu quando se comparou estatisticamente o número de fêmeas recolhidas/alimentadas nos compartimentos B dos túneis de controlo com os valores obtidos nos respectivos aparatos-teste. Para DEET n.º 2 ocorreu sempre, independentemente do ensaio e do número de lavagens a que foram submetidos os tecidos, uma

redução significativa do número de fêmeas recolhidas/alimentadas nos compartimentos B dos túneis-teste em comparação com o observado nos túneis-controlo homólogos. Para DEET n.º 3 os resultados das análises estatísticas variaram, para tecidos sempre sem lavagens, consoante o ensaio.

Tabela IV.3. Resultados obtidos com DEET n.º2 e n.º3 contra mosquitos *An. stephensi*, para as diferentes lavagens.

Tipo DEET N.º Lavagem	N.º ensaio	IRE	Estatística		BFI	Estatística	
DEET 2 Zero lavagens	1	71,89	$\chi^2 = 13,652$	$P = 2,20 \times 10^{-4}$	81,26	$\chi^2 = 22,126$	$P = 2,55 \times 10^{-6}$
	2	57,14	$\chi^2 = 23,511$	$P = 1,24 \times 10^{-6}$	69,44	$\chi^2 = 16,070$	$P = 6,10 \times 10^{-5}$
	3	50,00	$\chi^2 = 15,438$	$P = 8,53 \times 10^{-5}$	63,89	$\chi^2 = 13,083$	$P = 2,98 \times 10^{-4}$
DEET 2 5 lavagens	1	47,40	$\chi^2 = 32,407$	$P = 1,0 \times 10^{-8}$	61,05	$\chi^2 = 27,044$	$P = 2,0 \times 10^{-7}$
	2	53,24	$\chi^2 = 20,157$	$P = 7,13 \times 10^{-6}$	48,21	$\chi^2 = 7,522$	$P = 0,006$
	3	45,19	$\chi^2 = 16,990$	$P = 3,76 \times 10^{-5}$	48,33	$\chi^2 = 13,816$	$P = 2,02 \times 10^{-4}$
	4	61,11	$\chi^2 = 17,315$	$P = 3,17 \times 10^{-5}$	69,69	$\chi^2 = 25,574$	$P = 4,3 \times 10^{-7}$
	5	51,76	$\chi^2 = 15,895$	$P = 6,70 \times 10^{-5}$	52,90	$\chi^2 = 9,296$	$P = 0,002$
DEET 3 0 lavagens	1	36,88	$\chi^2 = 7,673$	$P = 0,006$	57,27	$\chi^2 = 17,534$	$P = 2,82 \times 10^{-5}$
	2	0,00	$\chi^2 = 0,021$	$P = 0,885$	-8,16	$\chi^2 = 0,180$	$P = 0,671$
	3	30,51	$\chi^2 = 5,153$	$P = 0,023$	49,74	$\chi^2 = 8,350$	$P = 0,004$
	4	44,31	$\chi^2 = 7,730$	$P = 0,005$	50,99	$\chi^2 = 7,805$	$P = 0,005$
	5	69,81	$\chi^2 = 28,829$	$P = 8,0 \times 10^{-8}$	75,51	$\chi^2 = 30,706$	$P = 3,0 \times 10^{-8}$
	6	9,54	$\chi^2 = 0,163$	$P = 0,686$	23,19	$\chi^2 = 1,336$	$P = 0,248$

Legenda: a **negrito**, os resultados indicadores de diferença significativa superior a 99% de confiança. **IRE:** índice de repelência; **BFI:** redução de refeição sanguínea; χ^2 : teste qui-quadrado (correção de Yates) com **g.I.** = 1 para todos os resultados apresentados. **Estatística:** Análise estatística para comparação entre o número de fêmeas presentes/alimentadas que foram recolhidas nos compartimentos B do túnel-teste e respectivo túnel-controlo.

Tabela IV.4. Resultados obtidos com citronela contra mosquitos *An. stephensi*, para as diferentes lavagens

Citronela N.º Lavagem	N.º ensaio	IRE	Estatística		BFI	Estatística	
Zero lavagens	1	12,50	$\chi^2 = 1,021$	$P = 0,312$	-12,50	$\chi^2 = 0,327$	$P = 0,567$
	2	4,93	$\chi^2 = 0,123$	$P = 0,726$	2,73	$\chi^2 = 0,004$	$P = 0,950$
	3	5,97	$\chi^2 = 0,198$	$P = 0,656$	5,88	$\chi^2 = 0,080$	$P = 0,778$
	4	51,14	$\chi^2 = 24,755$	$P = 6,5 \times 10^{-7}$	56,27	$\chi^2 = 19,121$	$P = 1,23 \times 10^{-5}$
	5	6,03	$\chi^2 = 0,137$	$P = 0,711$	10,21	$\chi^2 = 0,241$	$P = 0,623$
	6	26,74	$\chi^2 = 16,259$	$P = 5,53 \times 10^{-5}$	40,58	$\chi^2 = 25,574$	$P = 4,3 \times 10^{-7}$
	7	32,05	$\chi^2 = 12,745$	$P = 3,57 \times 10^{-4}$	38,33	$\chi^2 = 9,689$	$P = 0,002$
5 lavagens	1	4,80	$\chi^2 = 0,054$	$P = 0,816$	15,76	$\chi^2 = 0,569$	$P = 0,450$
	2	8,33	$\chi^2 = 0,327$	$P = 0,567$	7,14	$\chi^2 = 0,083$	$P = 0,773$
	3	8,76	$\chi^2 = 0,351$	$P = 0,554$	7,03	$\chi^2 = 0,067$	$P = 0,796$

Legenda: a **negrito**, os resultados indicadores de diferença significativa superior a 99% de confiança. **IRE:** índice de repelência; **BFI:** redução de refeição sanguínea; χ^2 : teste qui-quadrado (correção de Yates) com **g.I.** = 1 para todos os resultados apresentados. **Estatística:** Análise estatística para comparação entre o número de fêmeas presentes/alimentadas que foram recolhidas nos compartimentos B do túnel-teste e respectivo túnel-controlo.

Relativamente ao tecido tratado com o repelente natural sem e com lavagens (**Tabela IV.4**), os valores de IRE e BFI obtidos foram quase sempre baixos e frequentemente muito reduzidos. Exceptuou-se um dos ensaios com tecidos não lavados em que as estimativas destes índices rondaram o valor 50 (ensaio 4). Do mesmo modo, apenas em três ensaios de tecidos não lavados se observou diferenças significativas entre aparatos-controlo e teste no número de fêmeas colhidas/alimentadas.

IV.1.3. Avaliação do efeito de repelência, em condições laboratoriais, de um tecido de algodão tratado um produto anti-mosquito existente no mercado português.

Os resultados obtidos na exposição dos insectos ao tecido impregnado com produto desconhecido, existente no mercado português, da conhecida marca *Petit Patapon*[®], sem qualquer lavagem está representado na **Figura IV.7**. Como se pode observar nesta figura, a malha *Petit Patapon*[®] parece exercer efeito de repelência sobre as fêmeas de *An. stephensi* visto que, para todos os ensaios e para qualquer dos tempos de observação, a percentagem de fêmeas que transitaram para os compartimentos B dos túneis de teste foi sempre inferior aquelas observadas no tubo de controlo. Quando se compara a percentagem de fêmeas que passam no controlo e no correspondente ensaio, esta diferença é ainda mais marcante podendo ser verificada em todos os tempos de observação (**Anexo I**). Quanto à dinâmica de actividade dos insectos ao longo dos 120 minutos o padrão observado nos túneis-controlo e teste foi semelhante aos anteriormente descritos.

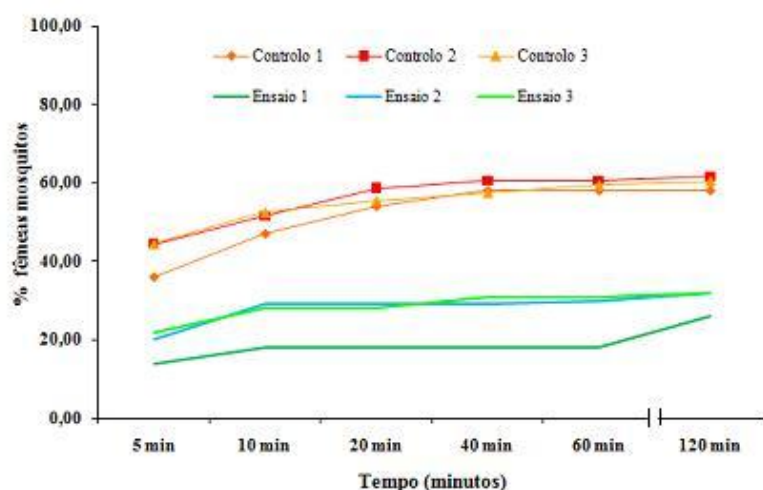


Figura IV.7. Efeito da repelência nos mosquitos fêmeas *Anopheles stephensi* quando expostas ao tecido impregnado da marca *Petit Patapon*[®] em comparação com o seu respectivo controlo, sem qualquer lavagem.

O cálculo da redução da refeição sanguínea (BFI) dos índices de repelência (IRE) foi efectuado pelas equações 1 e 2, respectivamente e encontram-se representados na tabela seguinte.

Tabela IV.5. Resultados obtidos com malha *Petit Patapon*® contra mosquitos *An. stephensi*.

<i>Petit Patapon</i> ® N.º Lavagem	N.º ensaio	IRE	Estatística		BFI	Estatística	
s/ lavagens	1	54,24	$\chi^2 = 19,604$	$P = 9,53 \times 10^{-6}$	85,11	$\chi^2 = 38,584$	$P < 0,001$
	2	50,50	$\chi^2 = 19,948$	$P = 7,96 \times 10^{-6}$	87,63	$\chi^2 = 43,291$	$P < 0,001$
	3	43,70	$\chi^2 = 13,007$	$P = 3,10 \times 10^{-4}$	85,27	$\chi^2 = 39,505$	$P < 0,001$

Legenda: Resultados indicadores de diferença significativa superior a 99% de confiança. **IRE:** índice de repelência; **BFI:** redução de refeição sanguínea; χ^2 : teste qui-quadrado (correção de Yates) com g.l. = 1 para todos os resultados apresentados. **Estatística:** Análise estatística para comparação entre o número de fêmeas presentes/alimentadas que foram recolhidas nos compartimentos B do túnel-teste e respectivo túnel-controlo.

Os índices de repelência e de redução da refeição sanguínea (BFI) foram sempre próximos ou superiores a 50 (**Tabela IV.5**). Do mesmo modo, a análise estatística revelou diferenças significativas em todos os ensaios entre os valores de fêmeas recolhidas/alimentadas nos compartimentos B dos túneis-teste e respectivos tubos-controlo.

Em relação à percentagem média de fêmeas alimentadas a malha *Petit Patapon*® apresentou resultados semelhantes apenas aos tecidos impregnados com permetrina (**Figura IV.8**).

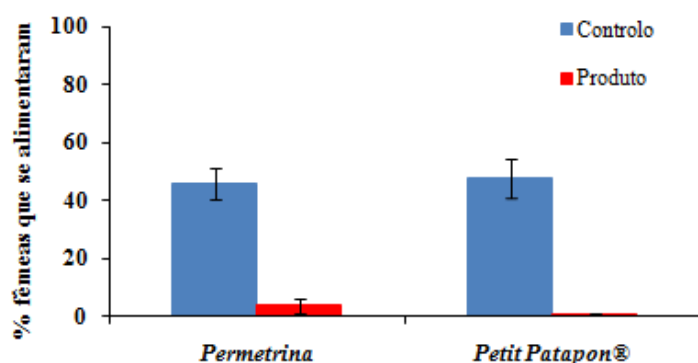


Figura IV.8. Comparação do produto testado (tecido com permetrina a zero lavagens) com produto análogo no mercado nacional (*Petit Patapon*®).

IV.2. Avaliação da repelência no campo com tecidos impregnados de permetrina, na área da Comporta.

Para os ensaios de campo foram seleccionados os tecidos que apresentaram melhores resultados laboratoriais. Assim, foram seleccionados tecidos impregnados com permetrina, e

perante a impossibilidade de se testarem toda a gama de lavagens, optou-se por testar tecidos sem lavagens e tecidos sujeitos a 25 e 50 lavagens. Teria sido interessante testar também tecidos com DEET n.º 2 micro-encapsulado. No entanto, devido à indisponibilidade do fabricante de proceder à manufactura da quantidade de tecido necessário para as experiências de campo, tal foi impossível de realizar. Os ensaios de repelência na Comporta, decorreram na época seca no período de 7 a 12 de Agosto de 2010, no âmbito do projecto TINAMAR. Cada colheita diária foi efectuada por um conjunto de quatro voluntários diferentes, designados de 1, 2, 3 e 4. Para análise de resultados, apenas foram considerados os mosquitos fêmeas capturados.

IV.2.1. Avaliar o efeito da impregnação no número de mosquitos fêmeas que pousaram sobre os tecidos tratados (perneiras com permetrina) e com diferentes números de lavagens.

IV.2.1.1. Resultados referentes ao número total de mosquitos colectados e às espécies capturadas.

De 2535 mosquitos fêmeas capturados durante os três ensaios sobre as perneiras impregnadas ou não com permetrina, 766 (30.22%) correspondem a colheitas sobre tecido não tratado (controlo), 342 (13.49%) àquelas efectuadas sobre tecido tratado e sem lavagens, 537 (21.18%) sobre tecido com permetrina e 25 lavagens e 890 (35.11%) a colheitas sobre tecido impregnado e sujeito a 50 lavagens (**Figura IV.9**).

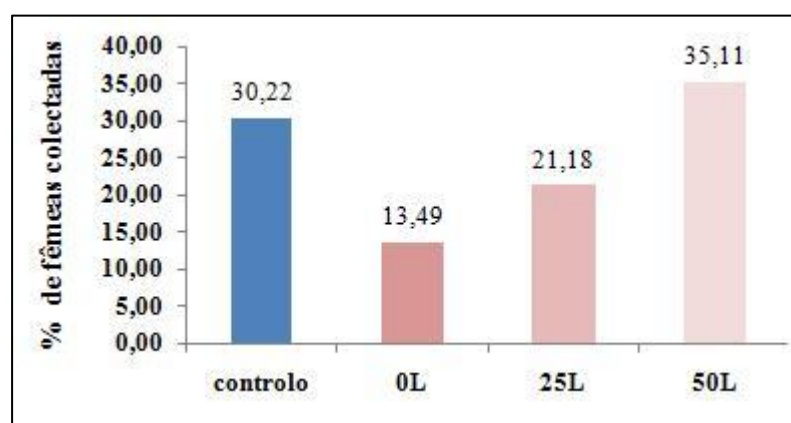


Figura IV.9. Percentagem total de fêmeas colectadas que pousaram sobre os tecidos (perneiras, sem e com tratamento).
Legenda: Controlo – tecido sem tratamento; 0L – tecido com permetrina sem lavagens; 25L – tecido com permetrina e com 25 lavagens e 50L – tecido com permetrina e com 50 lavagens.

Sendo assim, a maior percentagem de fêmeas colectadas corresponde a colheitas sobre tecido com permetrina e 50 lavagens, de seguida a colheitas sobre tecido sem tratamento (controlo), seguindo-se aquelas efectuadas sobre tecidos tratados com 25 lavagens e finalmente a colheitas sobre perneiras impregnadas e não lavadas.

As fêmeas capturadas nos ensaios com perneiras distribuíram-se por seis espécies: *Aedes* (*Ochlerotatus*) *caspius* Pallas, 1771 e *Aedes* (*Ochlerotatus*) *detritus* Haliday, 1833; *Anopheles* (*Anopheles*) *atroparvus* Van Thiel, 1927; *Culex* (*Culex*) *pipiens* Linnaeus, 1758; *Culex* (*Culex*) *theileri* Theobald, 1903; *Culex* (*Culex*) *univittatus* Theobald, 1901.

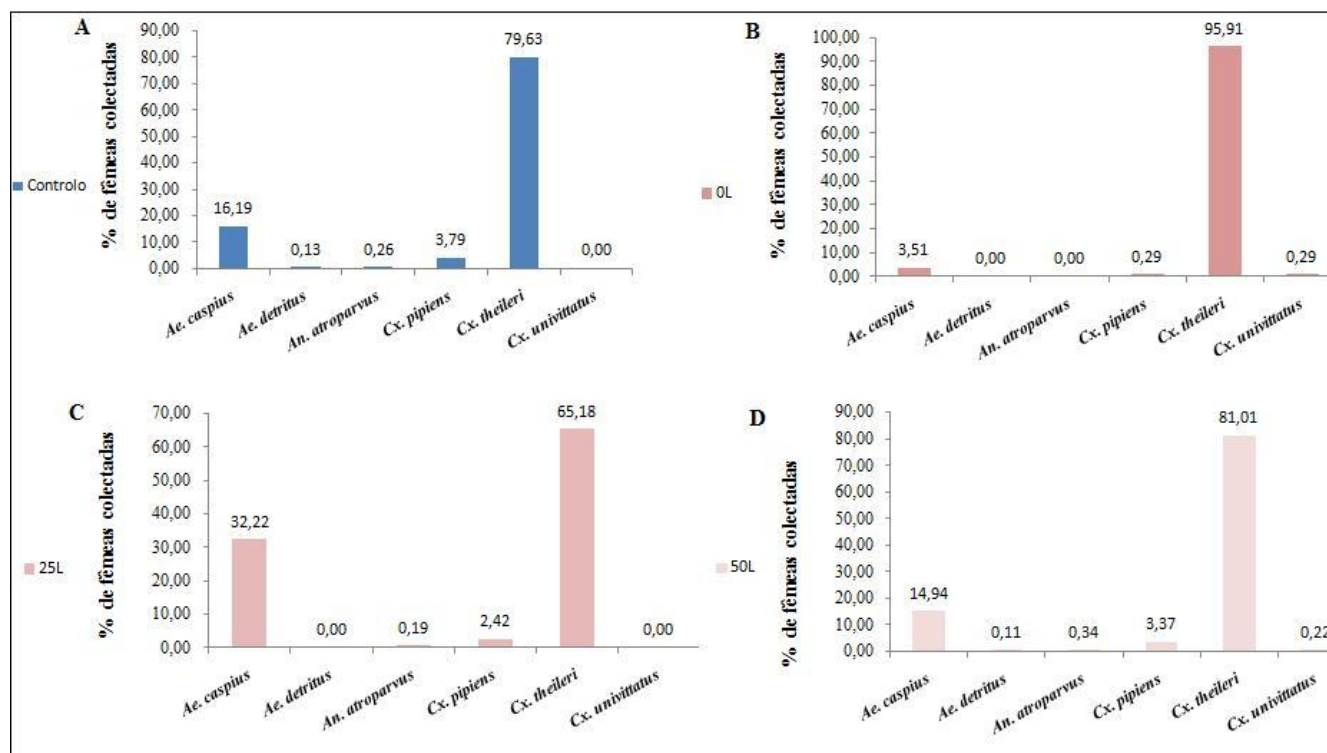


Figura IV.10. Análise quantitativa dos mosquitos colectados sobre os tecidos (perneiras, com e sem tratamento), na área da Comporta. **Legenda:** (A) Controlo – tecido sem tratamento; (B) 0L – tecido com permetrina e sem lavagens; (C) 25L – tecido com permetrina e com 25 lavagens e (D) 50L – tecido com permetrina e com 50 lavagens.

Pela análise da **Figura IV.10**, pode-se afirmar que das 2535 fêmeas colectadas na área da Comporta, a maior percentagem correspondeu à espécie *Cx. theileri* para todos os ensaios (tecido sem tratamento e com tratamento para as zero, 25 e 50 lavagens). É de salientar que nas colheitas sobre as perneiras sem lavagens, *Cx. theileri* correspondeu à quase totalidade das fêmeas capturadas (**Figura IV.10B**: 95.91%). A segunda espécie com maior número de espécimes colhidos foi *Ae.*

caspius, onde a maior percentagem de fêmeas colectadas, ocorreu sobre o tecido impregnado de permetrina com 25 lavagens (**Figura IV.10C**: 32.22%). A terceira espécie mais colectada foi a *Cx. pipiens*, presente numa percentagem mínima nas colheitas efectuadas sobre tecido com permetrina e sem lavagens (**Figura IV.10B**: 0.29%), e em percentagens semelhantes para os restantes tecidos (**Figura IV.10A, C e D**: 3.79%, 2.42% e 3.37%, respectivamente). A única espécie anofelínea, *An. atroparvus*, ausente nas perneiras tratadas sem lavagens, encontrou-se nas colheitas sobre os restantes tecidos em percentagens mínimas. Outra espécie colhida foi a *Cx. univitattus*, unicamente presente em percentagens residuais nas colheitas sobre perneiras sem (0.29%) e com 50 lavagens (0.22%). A menor percentagem de fêmeas colectadas correspondeu à espécie *Ae. detritus*, apenas presente nas perneiras sem tratamento (0.13%) e com tratamento e 50 lavagens (0.11%).

IV.2.1.2. Análise estatística aos resultados das capturas efectuadas sobre tecidos impregnados com perneiras sem lavagens ou sujeitos a diferentes ciclos de lavagens.

Na **Tabela IV.6** e **Figura IV.11**, encontram-se os resultados do tratamento estatístico descritivo efectuado aos dados das colheitas de culicídeos realizadas sobre as perneiras impregnadas ou não (controlo) com permetrina. As análises efectuadas referem-se ao número de fêmeas de culicídeos (mosquitos) de acordo com o tecido testado e segundo os dias de captura. Pela análise das referidas tabela e figura constata-se que a média e a mediana de fêmeas capturadas sobre tecido impregnado sem lavagens foi inferior às estimativas obtidas para os restantes tecidos. Estes parâmetros, assim como os valores máximos observados, variaram substancialmente entre os diferentes dias de colheita.

Tabela IV.6. Estatística descritiva dos resultados das capturas de mosquitos efectuados sobre tecido impregnado (perneiras) consoante o número de lavagens a que estes foram submetidos e para os três dias de ensaio.

		<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Tecido	Controlo	85	37	90,3	12	236
	0 Lavagens	38	8	64,6	1	199
	25 Lavagens	60	32	71,1	3	230
	50 Lavagens	99	33	132,3	5	410
Data	7 Agosto	137	109	117,3	4	410
	9 Agosto	61	35	68,3	2	236
	11 Agosto	12	13	9,31	1	34

Legenda: **Média:** Número médio de fêmeas de mosquito capturadas; **Mediana:** referente ao número de fêmeas capturadas; **Desvio padrão:** referente ao número de fêmeas capturadas; **Mínimo:** Número mínimo de fêmeas capturadas; **Máximo:** Número máximo de fêmeas capturadas; **Controlo** – colheitas sobre as perneiras dos voluntários não impregnadas; **0 Lavagens** - colheitas sobre as perneiras dos voluntários impregnadas com permetrina e sem lavagens; **25 Lavagens** - colheitas sobre as perneiras dos voluntários impregnadas com permetrina e com 25 lavagens e **50 Lavagens** - colheitas sobre as perneiras dos voluntários impregnadas com permetrina e com 50 lavagens.

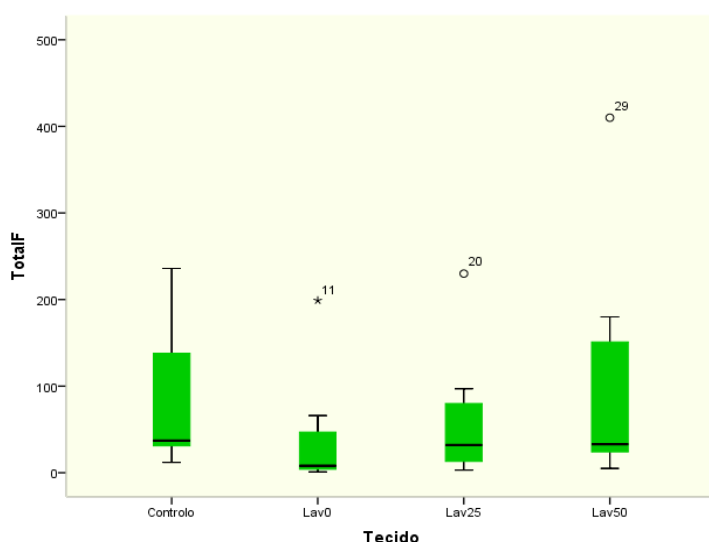


Figura IV.11. Resultados das colheitas efectuadas sobre tecidos impregnados (perneiras) e sujeitos a diferentes números de lavagem.

Legenda: **Total (F):** Número de fêmeas de mosquitos capturadas; **Linha negra:** valor da mediana referente ao número de fêmeas capturadas; **Espaçadores:** referentes ao número mínimo e máximo de fêmeas capturadas; **Barras verdes:** valores dos percentis 25 e 75 referentes ao número de fêmeas mosquitos capturadas; **11, 20, 29:** número das amostras (e respectivo número de mosquitos capturados) classificadas como “outliers”; **Controlo:** perneiras sem impregnação; **Lav0, 25 e 50:** perneiras impregnadas com permetrina sem lavagens, com 25 e 50 lavagens, respectivamente.

Quando se procedeu à análise estatística dos resultados, vestuário com 25 e 50 lavagens não demonstrou apresentar uma acção significativa contra a actividade de picada dos culicídeos. Em contrapartida, o uso de tecido tratado com permetrina mas sem lavagens mostrou reduzir significativamente o número de mosquitos que tentaram efectuar uma refeição sanguínea picando em zonas do corpo protegidas com vestuário tratado ($P = 0.008$).

As observações efectuadas com base na análise da estatística descritiva em relação ao número de mosquitos colectados nos diferentes dias de colheitas, foram confirmadas pela aplicação

de métodos estatísticos não paramétricos. Assim, pode-se afirmar que houve um decréscimo bastante significativo na abundância de mosquitos ao longo dos diferentes dias de ensaios (**Tabela IV.7**). Este decréscimo deverá estar associado à pulverização dos arrozais observada *in loco* e que ocorreu durante o período de colheitas.

Tabela IV.7. Comparação dos resultados entre colheitas efectuadas sobre os diferentes tecidos/lavagens e em as datas de captura diferentes.

		<i>Teste emparelhado de Wilcoxon</i>	<i>Teste de Friedman</i>
Tecido	Controlo vs 0 Lavagens	$Z = -2,67$ $P = \mathbf{0,008}$	
	Controlo vs 25 Lavagens	$Z = -1,25$ $P = 0,213$	N.A.
	Controlo vs 50 Lavagens	$Z = -0,30$ $P = 0,767$	
Data	7 Agosto vs 9 Agosto	$Z = -2,58$ $P = \mathbf{0,010}$	$X_2 = 16,2$ d.f. = 2 $P < \mathbf{0,001}$
	7 Agosto vs 11 Agosto	$Z = -3,06$ $P = \mathbf{0,002}$	
	9 Agosto vs 11 Agosto	$Z = -2,824$ $P = \mathbf{0,005}$	

Legenda: a **negrito**, os resultados indicadores de diferença significativa superior a 99% de confiança. **N.A.:** Não aplicável.

IV.2.2. Efeito de repelência de uma peça de vestuário impregnada (t-shirt) com diferentes ciclos de lavagens sobre o número de mosquitos que tentam picar os humanos em zonas expostas e não protegidas.

IV.2.2.1. Resultados referentes ao número total de mosquitos colectados e às espécies capturadas.

De 1974 mosquitos fêmeas colectados sobre os membros inferiores expostos de voluntários que envergavam t-shirts impregnadas com permetrina ou t-shirts sem impregnação, 678 (34.35%) correspondem a colheitas efectuadas em voluntários com vestuário não tratado (controlo), 529 (26.80%) foram colhidas em voluntários com vestuário impregnado e sem lavagens, 294 (14.89%) capturadas em voluntários com t-shirts com permetrina e 25 lavagens e os restantes 473 (23.96%) espécimes foram colhidos por voluntários com vestuário tratado e lavado 50 vezes (**Figura IV.12**). Assim, a maior percentagem de fêmeas colectadas corresponde a colheitas efectuadas por

voluntários com t-shirts sem tratamento (controle), seguindo-se as colheitas efectuadas com vestuário tratado e com 50 lavagens, zero lavagens e finalmente, fêmeas capturadas sobre os voluntários envergando t-shirts tratadas e com 25 lavagens. A maior diferença observada no número de mosquitos colectados, ocorreu entre o controle e as colheitas efectuadas pelos voluntários com vestuário impregnado e sujeito a 25 ciclos de lavagem.

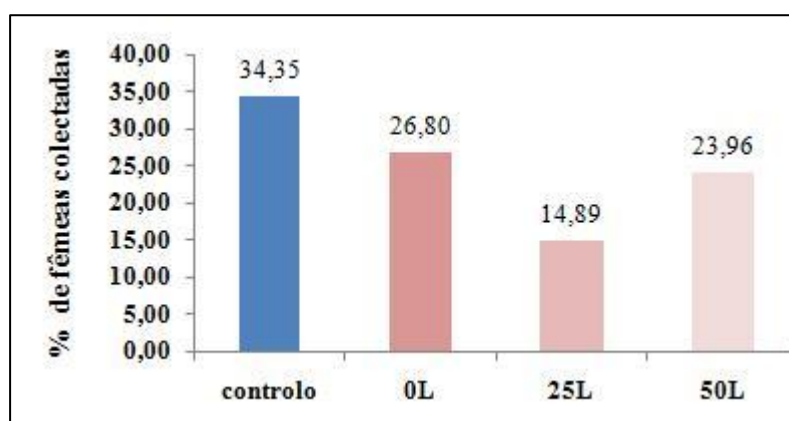


Figura IV.12. Percentagem total de fêmeas colectadas que pousaram sobre zonas expostas do corpo não protegidas, na presença de tecidos (t-shirts) sem e com tratamento. **Legenda:** Controle – tecido sem tratamento; 0L – tecido com permetrina e sem lavagens; 25L – tecido com permetrina e com 25 lavagens e 50L – tecido com permetrina e com 50 lavagens.

Tal como nas perneiras, dos 1974 mosquitos colectados sobre, a maior percentagem correspondeu a espécie *Cx. theileri* (**Figura IV.13A, B, C e D**). Seguiu-se a espécie *Ae. caspius*, onde a sua percentagem foi semelhante para todos os tecidos testados sem (29.65%) ou com permetrina e com zero (27.03%), 25 (34.35%) e 50 lavagens (28.12%). O mesmo se sucedeu para *Cx. pipiens*, a terceira espécie mais capturada, em que a percentagem de fêmeas colectadas foi semelhante para todos os tecidos testados, tratados e não tratados (**Figura IV.13A**: 4.72%; **B**: 3.02%; **C**: 5.44% e **D**: 4.02%), Para o caso da espécie anofelínea (*An. atroparvus*), ao contrário das perneiras, esta foi encontrada, embora em percentagens reduzidas, na presença dos vários tecidos (sem ou com tratamento). No caso dos mosquitos fêmeas *Cx. univitattus*, estas foram colhidas apenas pelos voluntários que envergavam as t-shirts impregnadas com 50 lavagens. A menor percentagem de mosquitos capturados, tal como no caso das perneiras, correspondeu à espécie *Ae. detritus* que foi capturada apenas nas áreas expostas e desprotegidas dos voluntários com t-shirts de tecido tratado e sem lavagens (0.19%).

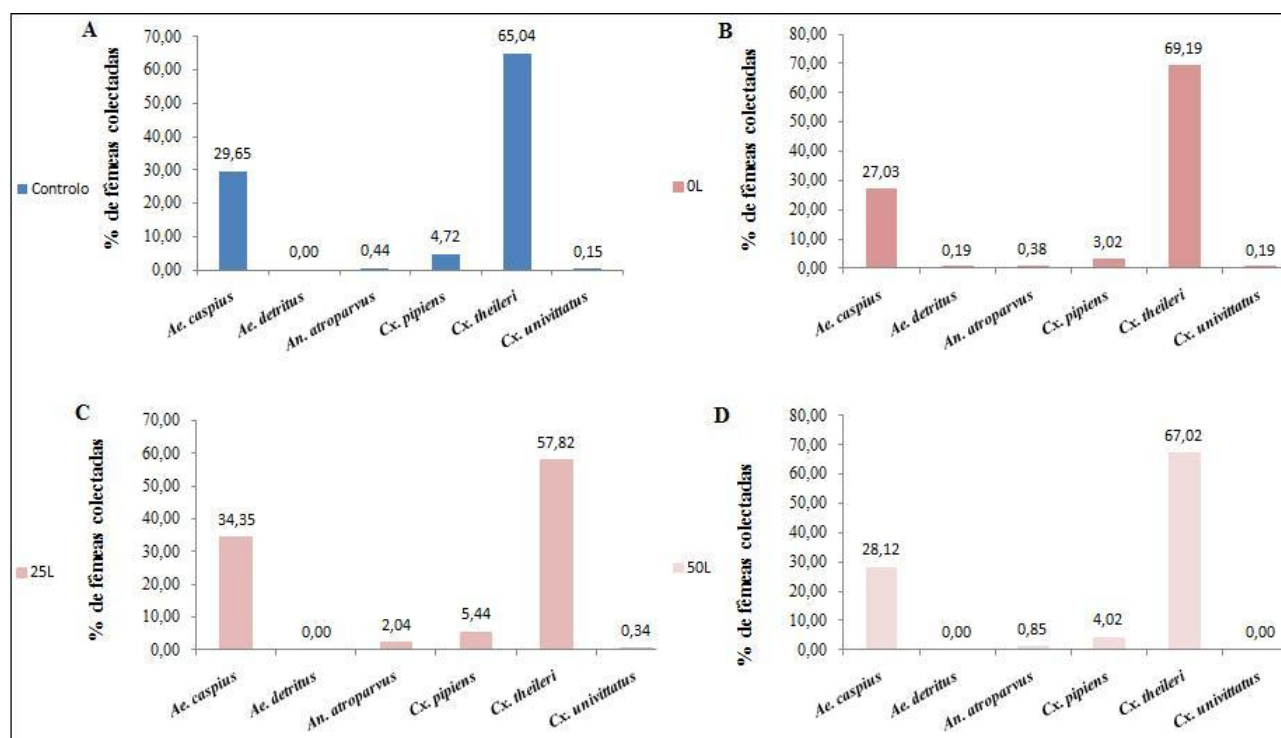


Figura IV.13. Análise quantitativa dos mosquitos colectados em zonas expostas do corpo não protegidas, na presença de tecidos (t-shirts com ou sem tratamento), na área da Comporta. Legenda: (A) Controlo – tecido sem tratamento; (B) 0L – tecido com permetrina e sem lavagens; (C) 25L – tecido com permetrina e com 25 lavagens e (D) 50L – tecido com permetrina e com 50 lavagens.

IV.2.2.2. Análise estatística aos resultados das capturas efectuadas sobre tecidos impregnados com t-shirt sem lavagens ou sujeitos a diferentes ciclos de lavagens.

Na Tabela IV.8 e Figura IV.14 encontram-se os resultados da análise estatística descritiva efectuada aos resultados obtidos com as colheitas de campo, realizadas sobre as zonas expostas de voluntários que envergavam peças de vestuário tratadas ou não com permetrina. Os valores apresentados referem-se apenas ao número de fêmeas de culicídeos capturadas. Os parâmetros apresentados foram estimados para os diferentes tecidos seleccionados (incluindo o tecido controlo sem qualquer tipo de impregnação) e para cada um dos dias de colheita. Os valores mais baixos para a média, mediana e número máximo de mosquitos capturados foram estimados para as capturas efectuadas sobre voluntários que vestiam t-shirts impregnadas com permetrina e sujeitas a 25 ciclos de lavagens.

Tabela IV.8. Estatística descritiva dos resultados das capturas de mosquitos efectuados sobre os membros expostos dos voluntários consoante o tipo de t-shirt que envergavam e os diferentes dias de captura.

		<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Tecido	Controlo	75	59	61,5	10	197
	0 Lavagens	59	54	63,7	7	213
	25 Lavagens	33	19	26,3	4	64
	50 Lavagens	53	37	49,1	8	135
Data	8 Agosto	88	69	53,6	19	213
	10 Agosto	44	27	52,5	8	197
	12 Agosto	32	14	35,7	4	122

Legenda: **Média:** Número médio de fêmeas de mosquito capturadas; **Mediana:** referente ao número de fêmeas capturadas; **Desvio padrão:** referente ao número de fêmeas capturadas; **Mínimo:** Número mínimo de fêmeas capturadas e **Máximo:** Número máximo de fêmeas capturadas. **Controlo** – colheitas sobre os voluntários com t-shirts não impregnadas; **0 Lavagens** - colheitas sobre os voluntários com t-shirts impregnadas com permetrina e sem lavagens; **25 Lavagens** - colheitas sobre os voluntários com t-shirts impregnadas com permetrina e com 25 lavagens e **50 Lavagens** - colheitas sobre os voluntários com t-shirts impregnadas com permetrina e com 50 lavagens.

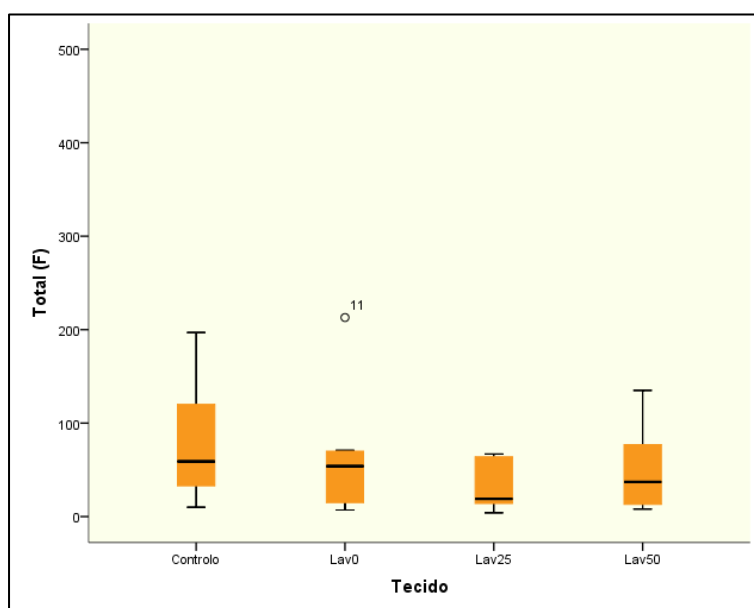


Figura IV.14. Resultados das colheitas efectuadas sobre membros expostos de voluntários que envergavam t-shirt sem (controlo) ou com impregnação com permetrina e sujeitos a diferentes número de lavagens.

Legenda: **Total (F):** Número de fêmeas de mosquitos capturadas; **Linha negra:** valor da mediana referente ao número de fêmeas capturadas; **Espaçadores:** referentes ao número mínimo e máximo de fêmeas capturadas; **Barras laranjas:** valores dos percentis 25 e 75 referentes ao número de fêmeas de mosquitos capturadas; **11:** número da amostra (e respectivo número de fêmeas capturadas) classificada como “outliers”; **Controlo:** t-shirts sem impregnação; **Lav0, 25 e 50:** t-shirts impregnadas com permetrina sem lavagens, com 25 e 50 lavagens, respectivamente.

No que se refere ao efeito protector de peças de vestuário (t-shirts) sobre áreas de pele não protegida, os resultados estatísticos dos testes não paramétricos apresentaram algumas divergências. Por um lado, na presença de t-shirts impregnadas sem lavagens, o número de mosquitos colectados por voluntários não foi significativamente diferente em relação as t-shirts sem tratamento. Por outro, quando os voluntários usaram t-shirts impregnadas com permetrina e lavadas 25 vezes, colectaram um número estatisticamente inferior ($P = 0.008$) aos que não usaram vestuário

impregnado (**Tabela IV.9**). Tal como na situação das perneiras, não foi verificada qualquer efeito de repelência das t-shirts tratadas a 50 lavagens.

Relativamente à comparação do número total de fêmeas de culicídeos capturadas nos diferentes dias de ensaio, verificou-se um decréscimo significativo do número de insectos capturados no dia 8 e no dia 10 (pós-pulverização dos arrozais). No entanto, a comparação entre os valores das colheitas efectuadas no dia 9 e 12 de Agosto, apesar de demonstrarem uma diminuição na abundância de mosquitos, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas (**Tabela IV.9**).

Tabela IV.9. Comparação dos resultados das colheitas efectuadas com t-shirts de diferentes tecidos/lavagens e datas diferentes de captura.

		<i>Teste emparelhado de Wilcoxon</i>	<i>Teste de Friedman</i>
Tecido	Controlo vs 0 Lavagens	$Z = -0,77$ $P = 0,441$	N.A.
	Controlo vs 25 Lavagens	$Z = -2,66$ $P = \mathbf{0,008}$	
	Controlo vs 50 Lavagens	$Z = -1,36$ $P = 0,173$	
Data	7 Agosto vs 9 Agosto	$Z = -2,43$ $P = \mathbf{0,015}$	$X_2 = 15,6$ d.f. = 2 $P < \mathbf{0,001}$
	7 Agosto vs 11 Agosto	$Z = -3,06$ $P = \mathbf{0,002}$	
	9 Agosto vs 11 Agosto	$Z = -1,16$ $P = 0,248$	

Legenda: a **negrito**, os resultados indicadores de diferença significativa superior a 99% de confiança. **N.A.:** Não aplicável.

IV.2.3. Estudo do efeito da atracção aos mosquitos pelos diferentes voluntários.

Embora as diferenças observadas na abundância de mosquitos existentes nos diferentes dias de colheita possam ter contribuído para a discrepância dos resultados obtidos com a utilização de perneiras e t-shirts impregnadas, procuram-se outros elementos que, de algum modo, possam ter influenciado estes resultados. Entre os factores que são frequentemente apontados como responsáveis pela variação do número de mosquitos capturados em colheitas simultâneas sobre iscos humanos encontram-se a eficácia e atractividade individual dos diferentes voluntários. É de

salientar que apenas três dos voluntários efectuaram a totalidade de dias de captura. Para além deste facto, uma vez que existiram quatro tipos de tecidos a testar em três dias de ensaios, nenhum dos voluntários testou a totalidade dos tecidos. As comparações possíveis entre os diferentes voluntários e os respectivos resultados são apresentados na **Tabela IV.10**. Sendo assim, é possível observar que as colheitas efectuadas por os diferentes voluntários não apresentam diferenças aquando do uso de perneiras mas, em contrapartida, na presença de t-shirts existe uma diferença significativa entre o voluntário 2 e o voluntário 3 ($P = 0.046$).

Tabela IV.10. Testes estatísticos sobre os resultados das capturas dos mosquitos efectuadas por diferentes voluntários.

		<i>Teste emparelhado de Wilcoxon</i>
Ensaio	Perneiras	
		Voluntário 1 vs Voluntário 2
		$Z = -1,78$
		$P = 0,075$
Ensaio	T-shirts	
		Voluntário 2 vs Voluntário 3
		$Z = -1,57$
		$P = 0,116$
Ensaio	T-shirts	
		Voluntário 1 vs Voluntário 2
		$Z = -0,14$
		$P = 0,893$
Ensaio	T-shirts	
		Voluntário 2 vs Voluntário 3
		$Z = -1,99$
		$P = 0,046$

Legenda: a **negrito**, resultado indicador de diferença significativa superior a 95% de confiança.

IV.3. Avaliação do efeito de repelência, em condições laboratoriais dos tecidos seleccionados para o estudo de campo em relação à espécie mais abundante na região da Comporta.

Na tentativa de explicar as diferenças observadas na eficácia dos tecidos impregnados com permetrina entre os testes de laboratório e os ensaios de campo, efectuaram-se algumas experiências preliminares, em sistema de túnel, utilizando como modelo biológico a espécie *Cx. theileri*, o culicídeo mais abundante na área de estudo onde decorreram as experiências de campo. Todo o procedimento experimental foi idêntico ao anteriormente descrito para a espécie *An. stephensi*.

Os resultados obtidos na exposição dos insectos ao tecido impregnado com permetrina sem e com 25 ciclos de lavagens está representado na **Figura IV.15**. Em todos os ensaios a percentagem de fêmeas que atingiram o compartimento B no túnel de controlo (**Figura IV.15A e B**, respectivamente), foi apenas ligeiramente superior à percentagem de culicídeos que passaram para o compartimento do isco do respectivo túnel-teste. Assim, para cada tipo de tecido (*i.e.* tecido sem e com 25 lavagem) a magnitude destas diferenças foram inferiores àquelas observadas para a espécie *An. stephensi*. Quanto à dinâmica de actividade dos insectos ao longo dos 120 minutos, esta foi semelhante.

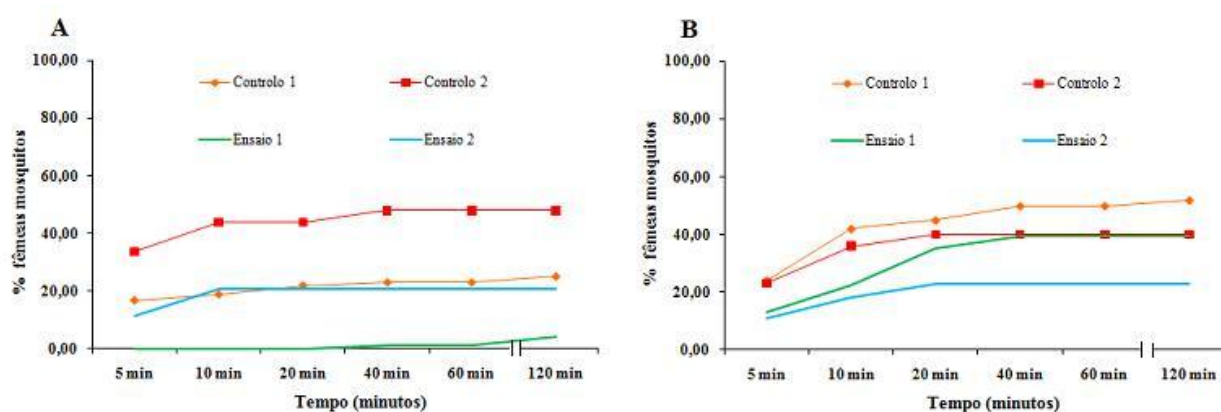


Figura IV.15. Efeito da repelência nos mosquitos fêmeas *Culex theileri* quando expostas ao tecido impregnado com permetrina em comparação com o seu respectivo controlo. (A) Tecido com permetrina e sem lavagens e (B) Tecido com permetrina e com 25 lavagens.

O cálculo da redução da refeição sanguínea (BFI) dos índices de repelência (IRE) foi efectuado pelas equações 1 e 2, respectivamente. Na **Tabela IV.11** apresentam-se os valores destes índices, bem como o tratamento estatístico efectuado em relação ao número de fêmeas que foram recolhidas/alimentadas nos compartimentos B.

Pela análise da **Tabela IV.11**, pode-se dizer que os índices de repelência e redução de refeição sanguínea foram elevados para os tecidos impregnados com permetrina e sem lavagens. No entanto, os valores destes dois índices não foram tão elevados quando estimados para os ensaios efectuados com tecidos tratados, mas sujeitos a 25 ciclos de lavagens. A comparação do número de fêmeas recolhidas nos compartimentos B e do número de fêmeas ingurgitadas em ensaios com tecidos impregnados e não lavados, demonstrou que os valores observados para estes dois

parâmetros foram estatisticamente diferentes entre os túneis-teste e controlo. O mesmo não se observou para os ensaios com tecidos sujeitos a lavagens, em que em apenas um dos ensaios apresentou um número de fêmeas presentes/alimentadas no compartimento B do túnel de teste estatisticamente inferior aos observados no tubo de controlo.

Tabela IV.11. Resultados obtidos com permetrina contra mosquitos *Cx. theileri*, para as diferentes lavagens.

Permetrina N.º Lavagem	N.º ensaio	IRE	Estatística		BFI	Estatística	
Zero lavagens	1	83,33	$\chi^2 = 15,094$	$P = 1,02 \times 10^{-4}$	100,00	N.A.	N.A.
	2	57,01	$\chi^2 = 14,968$	$P = 1,09 \times 10^{-4}$	73,06	$\chi^2 = 5,718$	$P = 0,017$
25 lavagens	1	22,76	$\chi^2 = 3,607$	$P = 0,054$	61,38	$\chi^2 = 10,881$	$P = 9,72 \times 10^{-4}$
	2	43,90	$\chi^2 = 6,641$	$P = 0,010$	42,86	$\chi^2 = 0,385$	$P = 0,535$

Legenda: a **negrito**, os resultados indicadores de diferença significativa superior a 99% de confiança. **N.A.:** Não aplicável; **IRE:** índice de repelência; **BFI:** redução de refeição sanguínea; χ^2 : teste qui-quadrado (correção de Yates) com **g.I.** = 1 para todos os resultados apresentados. **Estatística:** Análise estatística para comparação entre o número de fêmeas presentes/alimentadas que foram recolhidas nos compartimentos B do túnel-teste e respectivo túnel-controlo.

Comparando a percentagem média de fêmeas pertencentes às duas espécies de mosquitos testadas laboratorialmente (**Figura IV.16**), e que se alimentaram na presença do tecido impregnado com permetrina, foi obtida uma melhor resposta nos ensaios em que se utilizaram tecidos não lavados (*An. stephensi*: $3.71\% \pm 2.42$; *Cx. theileri*: $2.00\% \pm 2.83$), do que naqueles em que se testaram tecidos com 25 lavagens (*An. stephensi*: $7.43\% \pm 5.28$; *Cx. theileri*: $8.50\% \pm 6.36$). No entanto, as percentagens médias de fêmeas de *Cx. theileri* alimentadas em qualquer um dos aparatos (controlo ou teste) foram reduzidas e os desvios padrões a estas associados foram elevados.

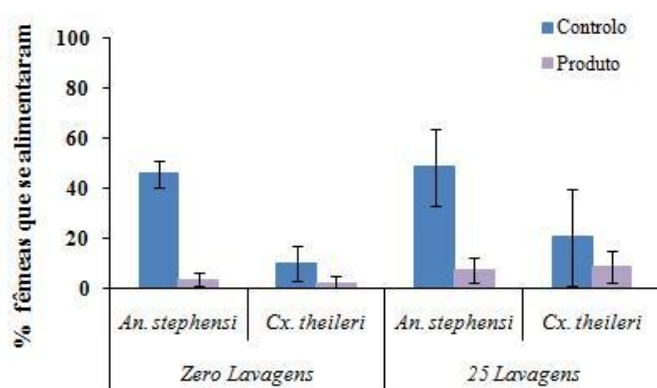


Figura IV.16. Comparação da repelência do mesmo tipo de tecido (permetrina para as zero e 25 lavagens) com duas espécies de mosquitos diferentes (*An. stephensi* e *Cx. theileri*), testadas em condições laboratoriais pelo sistema túnel.

V. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O uso de repelentes para insectos pode ter um papel importante na redução da transmissão de doenças, como a malária, dengue, filarioses, vírus do *West Nile*, entre outras. No entanto, o principal motivo para a aquisição de repelentes é evitar a incomodidade causada por mosquitos (Trongtokit *et al.*, 2005).

O mosquito *Anopheles stephensi* usado nos testes é um importante vector de malária na área urbana da Índia e Médio Oriente. Para além disso, é um mosquito com hábitos antropofílicos e deste modo pode actuar como factor de incomodidade. *Anopheles stephensi* apresenta ainda outras características biológicas que a tornam uma espécie fácil de colonizar em insectário: é estenogâmica, alimenta-se facilmente em vários mamíferos e necessita de apenas 1-2 semanas para concluir o seu desenvolvimento larvar. Os factores atrás apontados, assim como a elevada produtividade que as colónias desta espécie em regra apresentam, contribuíram de modo decisivo para a sua escolha como modelo biológico para os estudos laboratoriais.

No estudo inicial para a avaliação do efeito de repelência de tecidos tratados com três compostos activos contra a espécie *Anopheles stephensi*, verificou-se uma maior eficácia dos produtos tratados com permetrina, em seguidos daqueles com DEET e por último, os que tinham microcápsulas de citronela. A situação de repelência induzida pelo composto permetrina ainda se verificou nas 60 lavagens. O tecido com DEET micro-encapsulado não se mostrou suficientemente eficaz na indução de repelência, excepto naquele sujeito a 20 lavagens. Este resultado bizarro não pode ser explicado com base num possível erro no processo de micro-encapsulação do produto. Todo o tecido utilizado foi tratado como uma peça única durante a incorporação das microcápsulas. A eficiência deste procedimento foi analisada em microscopia electrónica, confirmando-se a incorporação uniforme das micro-cápsulas, na densidade pretendida. Só posteriormente se procedeu ao seccionamento do tecido em peças de tamanho inferior que então foram sujeitas a diferentes números de lavagens. Uma hipótese que explica este resultado incongruente é a

possibilidade de ter ocorrido um erro de marcação aquando do empacotamento das amostras. Assim, pode ter ocorrido uma troca entre os tecidos sujeitos a 20 lavagens e aqueles que não foram sujeitos a qualquer lavagem. Foram realizados ensaios adicionais para dois tecidos com o mesmo produto químico (DEET n.º 2 e DEET n.º 3) mas proveniente de fornecedores diferentes. Para estes tecidos o efeito de repelência foi mais evidente no caso das malhas testados com DEET n.º 2 do que nos tecidos com DEET n.º 3. Este resultado pode estar relacionado com uma variedade de factores. As microcápsulas são adquiridas já na forma final em que são incorporadas no tecido. A concentração do princípio activo, assim como a estrutura da microcápsula é desconhecida. Por outro lado, os dois tipos de tecidos foram sujeitos a dois processos de incorporação separados. Assim, e mesmo que a concentração de microcápsulas seja semelhante, por acção do ligante, estas podem ficar mais ou menos introduzidas na malha do tecido e consequentemente mais ou menos susceptíveis à ruptura. Em conclusão, as diferenças observadas poderão estar relacionadas com a fabricação das microcápsulas ou com o seu processo de incorporação. A diferença observada nos resultados obtidos com os tecidos tratados com o DEET na sua formulação original e os restantes poderá ainda estar associada à diferente atractividade dos mosquitos à cor do tecido. O tecido inicialmente testado apresentava cor azul-escura mas os outros dois (DEET n.º 2 e n.º 3) eram de cor branca. Alguns autores sugerem que os mosquitos tendem a pousar mais sobre as superfícies de tonalidades escuras do que sobre superfícies claras (Croft, 2007).

No que se refere aos tecidos tratados com microcápsulas do repelente natural citronela, estes não demonstraram apresentar qualquer efeito de repelência.

Quanto à dinâmica da actividade das fêmeas, e independentemente de se tratar de tecidos não tratados (controlos) ou com diferentes tipos de produto (permetrina, DEET ou citronela), esta foi semelhante para todos os ensaios, apenas diferindo entre si na percentagem de mosquitos que transitavam entre os compartimentos A e B de cada aparato. Grande parte da actividade ocorreu sempre durante os primeiros 20 minutos da experiência não tendo-se observado grande variação nos resultados após 1 hora de experiência. É importante salientar que ensaios anteriores a este estudo

demonstraram que o número de reutilizações dos tecidos aqui testados não influenciou o efeito dos diferentes compostos activos.

A eficácia dos tecidos tratados foi também analisada através das estimativas dos índices de repelência (IRE) e de redução da refeição sanguínea (BFI). Segundo as estimativas obtidas no cálculo destes índices e apenas com algumas excepções (IRE <40: vide **Tabela 1**: ensaio 2, zero lavagens; ensaio 1, 25 lavagens e ensaio 2, 60 lavagens) tecidos impregnados de permetrina, e sujeitos ou não a diferente número lavagens, são eficazes na protecção individual contra a picada de mosquitos. Estes resultados comprovam a eficácia da permetrina em roupas impregnadas ou em sprays para protecção pessoal demonstrada por outros estudos (Vatandoost & Hanafi-Bojd, 2008). Apesar da permetrina parecer bastante eficaz na protecção contra picada de mosquitos quando se seleccionam piretróides como base da estratégia de protecção pessoal, deve-se ter uma atenção especial às propriedades destes insecticidas (*e.g.* toxicidade), às respostas comportamentais das espécies-alvo, o seu estado de resistência ao composto seleccionado e a importância da incomodidade ou possibilidade de transmissão de doenças veiculada pelos mosquitos existentes nessa área (Hougard *et al.*, 2003). No entanto, a permetrina é o insecticida mais usado no controlo de infestações caseiras e programas de saúde pública, incluindo no controlo de piolhos em crianças (Katz *et al.*, 2008).

Em relação aos índices IRE e BFI estimados para os tecidos tratados com DEET (na sua formulação original) e DEET n.º 3, estes apresentaram grandes discrepâncias (**Tabela 2**), não se podendo inferir ao certo sobre o seu efeito de repelência. As razões que explicam estes resultados já foram debatidas anteriormente. Em contrapartida, os tecidos com microcápsulas de DEET n.º 2 apresentaram resultados indicadores de repelência (IRE) e elevados valores de BFI em todos os ensaios realizados, sendo por isso, um bom candidato na primeira linha de defesa contra a incomodidade causada por artrópodes-vectores. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos anteriores. N'Guessan *et al.* (2008) avaliaram a eficácia de libertação lenta do DEET micro-encapsulado aplicado a redes mosquiteiras contra vectores da malária. Esta rede tratada com DEET

provou repelir, reduzir a refeição sanguínea e matar mosquitos por um período de pelo menos 6 meses, em condições laboratoriais. Assim, N'Guessan *et al.* (2008) sugerem que o DEET também pode ser aplicado a roupas ou tecidos domésticos (*e.g.* cortinas) para redução da taxa de alimentação de fêmeas de mosquito. Estudos com *An. gambiae* demonstraram que DEET impregnado em redes mosquiteiras, apresentaram resultados semelhantes aos obtidos com DEET micro-encapsulado (Pennetier *et al.*, 2008; Pennetier *et al.*, 2009). Além disso, Pennetier *et al.* (2007) acreditam que é mais seguro impregnar roupas com repelentes do que com insecticidas, propondo como alternativa a impregnação combinada dos dois agentes. Estes autores demonstraram em laboratório, por sistema de túnel, que o uso combinado de repelente com um insecticida não-piretróide em redes mosquiteiras mostrou uma maior eficácia contra mosquitos anofelíneos, do que com redes impregnadas apenas com DEET (Pennetier *et al.*, 2007). Os resultados mostraram também níveis de eficácia desta combinação semelhantes aos obtidos com redes impregnadas com piretróides. Isto pode representar uma estratégia promissora para a gestão do controlo de mosquitos com resistência no gene *kdr*.

O uso de produtos naturais como repelentes de insectos está a tornar-se popular, devido apresentarem baixa toxicidade e aceitação geral dos consumidores (Specos *et al.*, 2010). Neste estudo, os ensaios efectuados com o repelente natural citronela (geralmente utilizado na forma de vela ou como difusor ,fora das habitações) apresentaram índices de repelência (IRE) e de redução sanguínea (BFI) muito reduzidos, confirmando as conclusões retiradas da primeira análise efectuada aos resultados. Os produtos precisam de fornecer pelo menos 50% de taxa de repelência para serem validados como eficientes (Müller *et al.*, 2009). Esta situação apenas foi verificada uma única vez no ensaio 4 (**IRE**: 51.14; **BFI**: 56.27) efectuado a tecidos não lavados. Duas outras excepções referem-se aos ensaios 6 e 7 para tecidos não lavados, onde se registou um número anormalmente elevado de mosquitos nos compartimentos B do controlo e do túnel-teste. Nestes ensaios o número de fêmeas ingurgitadas/presentes nos compartimentos B dos túneis-controlo foi estatisticamente superior ao número de fêmeas registado nos compartimentos B dos respectivos túneis-teste.

Apesar de os tecidos com microcápsulas de repelente natural citronela não se terem mostrado eficazes contra as picadas de mosquitos, estudos prévios com piolhos humanos em crianças mostraram que este composto diminui a re-infestação (quando aplicado sobre a forma de loção capilar) sendo assim uma ferramenta alternativa aos piretróides (Mumcuoglu *et al.*, 2004). Além disso, mangas de algodão impregnadas com citronela foram eficazes a repelir mosquitos por 5 dias, em condições laboratoriais. No entanto, o mesmo produto quando aplicado na pele na forma de óleo foi eficaz apenas por umas horas (Mumcuoglu *et al.*, 2004). A micro-encapsulação deste produto, como alternativa à impregnação, tem as vantagens de diminuir fortemente o seu odor e a possibilidade de se desenvolver uma dermatose devido à sua aplicação tópica (Mumcuoglu *et al.*, 2004). Os preparados de nano-emulsões com óleo de citronela encapsulado por homogeneização a alta pressão, têm a vantagem acrescida de permitirem uma libertação lenta do óleo aumentando o tempo de protecção contra mosquitos (Sakulku *et al.*, 2009). Contrariamente aos resultados obtidos durante este trabalho Specos *et al.* (2010) observaram que tecidos tratados com citronela micro-encapsulada, apresentavam um aumento significativo da actividade de repelência (mais de 90% até as três semanas). É assim necessário re-avaliar as concentrações de citronela micro-encapsulada utilizada nos tecidos testados neste trabalho. Será igualmente importante explorar o efeito sinérgico de misturas de óleos repelentes, bem como a procura de novos aditivos que aumentem a durabilidade da protecção (Nerio *et al.*, 2010).

A permetrina provoca forte excitação do sistema nervoso do insecto, bloqueando os movimentos de sódio para as células nervosas e conduzindo paralisia do artrópode (Katz *et al.*, 2008). O DEET para além da sua acção de repelência apresenta também efeito neurotóxico através da alteração da função neuronal e da transmissão sináptica dos insectos. Este composto leva a um aumento da libertação de acetilcolina no espaço sináptico, actuando como um inibidor da acetilcolinesterase (Pennetier *et al.*, 2008; Pennetier *et al.*, 2009). No entanto, durante nenhum dos ensaios (com tecidos impregnados com permetrina ou com microcápsulas de DEET) se registou mortalidade dos espécimes ensaiados, levando a crer que, tal como em estudos anteriores

(Pennetier *et al.*, 2010), os compostos actuaram mais como um agente repelente do que como insecticida.

Parte dos tecidos testados neste trabalho foram impregnados com um insecticida através de um método convencional e parte deles foram sujeitos a uma tecnologia inovadora de incorporação de compostos repelentes: a micro-encapsulação. N'Guessan *et al.* (2008) demonstraram que a micro-encapsulação pode ser uma ferramenta útil no prolongamento do efeito de repelência. A aplicação de repelentes/insecticidas em têxteis em comparação com a sua utilização directa na pele, diminui as taxas de absorção e/ou de evaporação destes compostos. Assim micro-encapsulação de repelentes voláteis e sua incorporação em tecidos possui a capacidade de prolongar no tempo a sua eficácia. Contudo, as microcápsulas de DEET não foram produzidas para serem resistentes às lavagens ao contrário da impregnação com permetrina. É disto exemplo a existência desde há alguns anos de redes mosquiteiras de LLIN (*long-lasting insecticidal nets*). O processo de lavagem dos tecidos demonstrou pouco afectar a eficácia destes no que se refere à sua acção de repelência de mosquitos e inibição da refeição sanguínea destes últimos. Esta observação só é passível de ser efectuada para os tecidos tratados com permetrina e com DEET n.º 2, pois apenas estes demonstraram ter um efeito robusto e reprodutível sobre a actividade culicídica.

Neste trabalho, testou-se adicionalmente uma malha impregnada com produto desconhecido existente no mercado nacional, da conhecida marca *Petit Patapon*[®]. Os resultados obtidos em todos os ensaios realizados com este tecido em sistema túnel, contra fêmeas *An. stephensi*, comprovaram a eficiência deste na prevenção de picadas de mosquitos. Comparando os resultados da malha *Petit Patapon*[®] com os obtidos nos tecidos analisados durante este estudo, só se obtiveram resultados similares nos tecidos impregnados com permetrina e sujeitos a zero ou 5 lavagens. Assim, apesar do produto impregnado na malha *Petit Patapon*[®] ser desconhecido, os resultados indiciam a possibilidade de este ser o insecticida permetrina. O odor presenciado aquando dos ensaios laboratoriais também corrobora esta hipótese. Estes resultados demonstram o potencial uso comercial do tecido impregnado com permetrina na protecção contra as picadas de mosquitos.

Contudo, e especialmente no caso de vestuário infantil, parece-nos essencial que os produtos existentes no mercado passem a apresentar nas etiquetas informações sobre o composto impregnado, a concentração usada e a sua eficácia nos testes laboratoriais e/ou no terreno.

Após os ensaios laboratoriais, decidiu-se seleccionar três tecidos impregnados com permetrina com diferente número de lavagens para serem avaliados num estudo de campo. A selecção do número de lavagens a testar foi efectuada com base na sua eficácia e no número estimado de lavagens a que uma peça de vestuário de malha de algodão é geralmente sujeita. Como tal, foram escolhidos tecidos sem qualquer lavagem e tecidos sujeitos a 25 e 50 lavagens. A riqueza específica e a abundância relativa das diferentes espécies foram semelhantes quando estimadas com base nas colheitas efectuadas sobre as perneiras ou naquelas efectuadas sobre os membros inferiores de voluntários com t-shirts impregnadas ou sem tratamento. Os ensaios de repelência/protecção na área da Comporta demonstraram que a eficácia do tecido impregnado em situação real é afectada pelo número de lavagens. Embora se tenha observado uma redução significativa do número de mosquitos que pousam sobre tecido impregnado (perneiras) sem ser sujeito a lavagens, tal não aconteceu com o vestuário com 25-50 lavagens.

No que se refere ao efeito protector de peças de vestuário sobre áreas de pele não protegida (t-shirt) os resultados são inconsistentes. O número de mosquitos colectados por voluntários envergando vestuário impregnado e sem lavagens não foi significativamente diferente do número de mosquitos colhidos por colectores sem protecção. No entanto, voluntários usando t-shirts impregnadas com permetrina e lavadas 25 vezes colectaram um número estatisticamente inferior ao dos colectores que não usaram vestuário impregnado. Embora o decréscimo observado na densidade de mosquitos ao longo dos três dias de colheitas possa ter contribuído para este resultado, este poderá ainda estar associado ao próprio voluntário, à sua eficiência como colector ou ao seu nível de atractividade para os mosquitos. Sendo assim, a eficácia das perneiras foi suficientemente consistente para que a diferença de atractividade dos hospedeiros ou a sua eficácia na colecta de mosquitos não influenciasse os resultados. Quanto às t-shirts observou-se uma diminuição no

número de mosquitos que tentaram picar o hospedeiro, mas esta não é significativa do ponto de vista estatístico, podendo-se afirmar que as t-shirts impregnadas com permetrina com ou sem lavagens não conferem uma protecção adequada contra as picadas de mosquitos.

Uma variedade de factores encontram-se implicados no modo de como um repelente/insecticida pode ser efectivo. Nomeadamente, a espécie-alvo e a sua densidade na área; a idade, sexo, nível de actividade física e atractividade dos usuários para artrópodes picadores, e; factores ambientais tais como a temperatura, humidade e velocidade do vento (Fradin & Day, 2002). O conhecimento sobre o comportamento das diferentes espécies de mosquito na procura de um hospedeiro na presença de barreiras físicas (redes mosquiteiras) ou químicas (repelente na pele, ITN ou compostos voláteis em habitações) é crucial na definição de estratégias de controlo. Actualmente, ainda existem algumas lacunas no conhecimento sobre o comportamento dos mosquitos na presença de materiais tratados e da eficiência destes como medida de protecção pessoal. Quando se aplicam repelentes a peças de vestuário está-se a adicionar, ao estímulo inato do hospedeiro humano, estímulos químicos externos. Ao comparar-se os resultados obtidos nos ensaios laboratoriais com a espécie *An. stephensi*, com aqueles resultantes das experiências de campo, onde a espécie mais abundante foi *Cx. theileri*, estamos a introduzir na nossa análise um factor extra. Sabendo que existe toda uma gama de diferenças entre duas espécies de mosquitos ao nível genético, biológico, fisiológico e etológico, estas também se poderão reflectir ao nível do comportamento de procura do hospedeiro (Pennetier *et al.*, 2009). Estas diferenças podem estar na base das discrepâncias obtidas na eficácia dos tecidos testados nas duas situações: a laboratorial, onde se utilizou um modelo biológico específico, sujeito a condições ambientais controladas, e a situação real, dinâmica e sujeita a todo tipo de interferências. Assim, este estudo passou a uma terceira fase: análise laboratorial da eficácia de tecidos impregnados com permetrina na prevenção de picadas por fêmeas de *Cx. theileri*. Os resultados demonstraram que tecidos tratados com este insecticida e não sujeitos a lavagens apresentaram elevados valores de IRE e BFI, o mesmo não acontecendo sempre quando submetidos a um ciclo de 25 lavagens. Existe assim alguma evidência

experimental que suporta a hipótese colocada, de que diferentes espécies de mosquitos podem apresentar comportamentos distintos na presença do mesmo composto químico. No entanto, estes resultados devem ser interpretados com alguma cautela pois o número de ensaios laboratoriais efectuados com *Cx. theileri* foi muito reduzido. A razão para tais resultados pode ainda dever-se a um comportamento de picada anómalo da espécie *Cx. theileri*, nas condições impostas pelo protocolo experimental. As percentagens médias de fêmeas alimentadas observadas em qualquer um dos aparatos (controlo ou teste) foram reduzidas e os desvios padrões a estas associados foram elevados, o que indicia que as fêmeas de *Cx. theileri* apresentaram um comportamento de picada muito variável entre ensaios.

VI. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados mostraram que o uso de tecidos tratados com insecticidas/repelentes pode ser uma potencial ferramenta na prevenção de picadas de mosquitos. O DEET ganhou uma aceitação ampla na comunidade e é usado em muitos países do mundo sob a forma de repelente tópico (o mais efectivo actualmente no mercado). Apesar de reacções tóxicas poderem acontecer, esta substância possui um perfil de segurança aceitável ao longo dos 40 anos de uso. Este conceito poderá ter futuras potencialidades práticas para o controlo de doenças transmitidas por mosquitos, nomeadamente a malária. Na generalidade, este estudo focou a necessidade de melhorar o conhecimento sobre vectores e os seu comportamento de picada na presença de materiais tratados. Este estudo confirma que o uso de roupas impregnadas é um método promissor contra a protecção de picadas de insectos e, que pode ser recomendado para proteger pessoas durante surtos epidémicos (quer a população local, quer os viajantes). A prevenção dos viajantes é um factor essencial na diminuição do risco de uma possível introdução de efemeridades em novas áreas. Além disso, possibilita a limitação da exposição das pessoas a outros produtos mais tóxicos aplicados directamente na pele. Contudo, existe a necessidade de assegurar a eficácia da durabilidade das

roupas impregnadas sendo que a micro ou mesmo a nano-encapsulação dos repelentes/insecticidas pareça ser uma via promissora para atingir esta finalidade.

Apesar da potencialidade promissora dos produtos químicos como repelentes de mosquitos, existe uma necessidade crescente de se encontrar repelentes naturais para o uso comum de populações em zonas endêmicas, especialmente aqueles que possam ser cultivados localmente e processados com baixa tecnologia.

Os resultados obtidos com tecidos contendo micro-cápsulas de DEET, e para que estes possam ser usados como medida preventiva para a picada de mosquitos, mostraram serem necessários mais testes laboratoriais. Antes de encarar a comercialização destes produtos será necessário perceber qual a causa da discrepância observada na eficiência dos tecidos que continham microcápsulas de DEET provenientes de diferentes fornecedores, testar a influência das diferentes cores dos tecidos e estender os ensaios a outras espécies anofelíneas e não-anofelíneas. Para além disso, seria particularmente interessante determinar quais e como os órgãos sensoriais são afectados nas diferentes espécies de mosquitos, quando expostos ao mesmo tipo de composto.

Investigações na pesquisa de repelentes naturais deveriam continuar, contribuindo assim para a procura de uma ferramenta alternativa de menor toxicidade para aos produtos químicos mais usados e actualmente existentes no mercado.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, D., Bouma, M.J. & Pascual, M., 2010. Epidemic malaria and warmer temperatures in recent decades in the East African highland. *Proceedings of Biological Sciences/The Royal Society*, doi: 10.1098/rspb.2010.2020 (em revisão).
- Ascoli, V., Senis, G., Zucchetto, A., Valerio, L., Facchinelli, L., Budroni, M., Dal Maso, L. & Colluzi, M., 2009. Distribution of ‘promoter’ sandflies associated with incidence of classic Kaposi’s sarcoma. *Medical and Veterinary Entomology*, **23**: 217–25.
- Balashov, Y.S., 1984. Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. *Annual Review of Entomology*, **29**:137–56.
- Bothe, M. & Donahue, N.M., 2010. Organic aerosol formation in citronella candle plumes. *Air Quality, Atmosphere, & Health*, **3**(3):131–7.
- Clements, A.N., 1992. *The biology of mosquitoes. Volume 1: Development, nutrition and reproduction*. Chapman & Hall, London, 509 pp.
- Clements, A.N., 1999. *The biology of mosquitoes. Volume 2: Sensory reception and behaviour*. CABI Publishing, New York, 740 pp.
- Croft, A.M., 2007. Malaria: prevention in travellers. *Clinical Evidence*, **11**:903.
- Dame, D.A., Curtis, C.F., Benedict, M.Q., Robinson, A.S. & Knols, B.G., 2009. Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. *Malaria Journal*, **8**:S2.
- Ditzen, M., Pellegrino, M. & Vossell, L.B., 2008. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science*, **319**(5871):1838–42.
- Eldridge, B.F. & Edman, J.D., 2004. *Medical entomology: A textbook on public health and veterinary problems caused by arthropods* (Revised Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 672 pp.
- Fahrenhorst, M., Knols, B.G., Thomas, M.B., Howard, A.F., Takken, W., Rowland, M. & N’Guessan, R., 2010. Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against West African insecticide-resistant *Anopheles gambiae* mosquitoes. *PLoS One*, **5**(8):e12081.

- Fasanella, A., Scasciamacchia, S., Garofolo, G., Giangaspero, A., Tarsitano, E. & Adone, R., 2010. Evaluation of the house fly *Musca domestica* as a mechanical vector for an anthrax. *PLoS One*, **5**(8):e12219.
- Faulde, M.K., Albiez, G. & Nehring, O., 2010. Insecticidal, acaricidal and repellent effects of DEET- and IR3535-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating technique. *Parasitology research*, **106**(4):957–65.
- Finlayson, C., Alyokhin, A., Gross, S. & Porter, E., 2010. Differential consumption of four aphid species by four lady beetle species. *Journal of Insect Science*, **10**(31):1–10.
- Foil, L.D. & Gorham, J.R., 2000. Mechanical transmission of disease agents by arthropods, pp. 461514. In B. F. Eldridge & J. D. Edman (eds.), *Medical entomology: a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropods*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Fradin, M.S. & Day, J.F., 2002. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *The New England Journal of Medicine*, **347**(1):138.
- Gibson, G. & Russel, I., 2006. Flying in tune: sexual recognition in mosquitoes. *Current Biology*, **16**(13): 131116.
- Gubler, D.J., 2009. Vector-borne diseases. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, **28**(2): 583–8.
- Hougard, J.M., Duchon, S., Darriet, F., Zaim, M., Rogier, C. & Guillet, P., 2003. Comparative performances, under laboratory conditions, of seven pyrethroid insecticides used for impregnation of mosquito nets. *Bulletin of the World Health Organization*, **81**(5):324–33.
- Karunamoorthi, K. & Sabesan, S., 2009. Field trials on the efficacy of DEET-impregnated anklets, wristbands, shoulder, and pocket strips against mosquito vectors of disease. *Parasitology research*, **105**(3):641–5.
- Kasting, G.B., Bhatt, V.D. & Speaker, T.J., 2008. Microencapsulation decreases the skin absorption of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Toxicology in vitro*, **22**(2):548–52.

- Katz, T.M., Miller, J.H. & Hebert, A.A., 2008. Insect repellents: historical perspectives and new developments. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **58**(5):865–71.
- Kweka, E.J., Mwang'onde, B.J., Lyaruu, L., Tenu, F. & Mahande, A.M., 2010. Effect of different hosts on feeding patterns and mortality of mosquitoes (Diptera: Culicidae) and their implications on parasite transmission. *Journal of Global Infectious Diseases*, **2**(2):121–3.
- Lane, R.P. & Crosskey R.W., 1993. *Medical insects and arachnids*. Chapman & Hall, London, 723 pp.
- Lehane, M.J., 2005. *The biology of blood-sucking in insects* (Second Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 336 pp.
- Logan, J.G., Stanczyk, N.M., Hassanali, A., Kemei, J., Santana, A.E., Ribeiro, K.A., Pickett, J.A. & Mordue Luntz, A.J., 2010. Arm-in-cage testing of natural human-derived mosquito repellents. *Malaria Journal*, **9**:239.
- Lord, C.C., 2007. Modeling and biological control of mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **23**(2):252–64.
- Marquardt, W.C., 2010. *Biology of disease vectors* (Second Ed.). Academic Press, Amestardam, 785 pp.
- Martínez-de la Puente, J., Merino, S., Lobato, E., Rivero-de Aguilar, J., del Cerro, S. & Ruiz-de-Castañeda, R., 2009. Testing the use of a citronella-based repellent as an effective method to reduce the prevalence and abundance of biting flies in avian nests. *Parasitology research*, **104**(5):1233–6.
- Mazumder, D.N., Das Gupta, J., Chakraborty, A.K., Chatterjee, A., Das, D. & Chakraborti, D., 1992. Environmental pollution and chronic arsenicosis in south Calcutta. *Bulletin of the World Health Organization*, **70**(4):481–5.
- McHugh, C.P., 1994. Arthropods: Vectors of disease agents. *Laboratory Medicine*, **25**(7): 429–37.

- Mukabana, W.R., Takken, W., Coe, R. & Knols, B.G., 2002. Host-specific cues cause differential attractiveness of Kenyan men to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, **1**:17.
- Mukabana, W.R., Takken, W., Killen, G.F. & Knols, B.G., 2004. Allomonal effect of breath contributes to differential attractiveness of humans to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, **3**(1):1.
- Mullen, G.R. & Durden, L., 2009. *Medical and veterinary entomology* (Second Ed.). Academic Press, Amestardam, 930 pp.
- Müller, G.C., Junnila, A., Butler, J., Kravchenko, V.D., Revay, E.E., Weiss, R.W. & Schlein, Y., 2009. Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. *Journal of Vector Ecology*, **34**(1):2–8.
- Mumcuoglu, K.Y., Magdassi, S., Miller, J., Ben-Ishai, F., Zentner, G., Helbin, V., Friger, M., Kahana, F. & Ingber, A. 2004. Repellency of citronella for head lice: double-blind randomized trial of efficacy and safety. *The Israel Medical Association Journal*, **6**(12):756–9.
- Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J. & Stashenko, E., 2010. Repellency activity of essential oils: a review. *Bioresource Technology*, **101**(1):372–8.
- N'Guessan, R., Darriet, F., Doannio, J.M., Chandre, F. & Carnevale, P., 2001. Olyset[®] Net efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* after 3 years' field use in Côte d'Ivoire. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**(1):97–104.
- N'Guessan, R., Knols, B.G., Pennetier, C. & Rowland, M., 2008. DEET microencapsulation: a slow-release formulation enhancing the residual efficacy of bednets against malaria vectors. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **102**(3):259–62.
- Pates, H. & Curtis C., 2005. Mosquito behavior and vector control. *Annual Review of Entomology*, **50**:53–70.

- Pennetier, C., Corbel, V., Boko, P., Abibatou, O., N'Guessan, R., Lapied, B. & Hougard J.M., 2007. Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, **6**:38.
- Pennetier, C., Constantini, C., Corbel, V., Licciardi, S., Dabiré, R.K., Lapied, B., Chandre, F. & Hougard J.M., 2008. Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. *Emerging Infectious Diseases*, **14**(11):1707–14.
- Pennetier, C., Constantini, C., Corbel, V., Licciardi, S., Dabiré, R.K., Lapied, B., Chandre, F. & Hougard J.M., 2009. Synergy between repellents and organophosphates on bed nets: efficacy and behavioural response of natural free-flying *An. gambiae* mosquitoes. *PloS One*, **4**(11):e7896.
- Pennetier, C., Chabi, J., Martin, T., Chandre, F., Rogier, C., Hougard J.M. & Pages, F., 2010. New protective battle-dress impregnated against mosquito vector bites. *Parasites & Vectors*, **3**:81.
- Petersen, J.J., Willis, O.R. & Chapman, H.C., 1978. Release of *Romanomermis culicivorax* for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador I. Mass production of the nematode. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **27**(6):1265–7.
- Pitts, R.J. & Zwiebel, L.J., 2006. Antennal sensilla of two female anopheline sibling species with differing host ranges. *Malaria Journal*, **5**:26.
- Ramirez, J.L., Garver, L.S. & Dimopoulos, G., 2009. Challenges and approaches for mosquito targeted malaria control. *Current Molecular Medicine*, **9**(2):116–30
- Ramos, H., Novo, M. T., Sousa, C., Almeida, P., Parreira, R., Cândida, M., Diniz, M., Galão, R., Carvalho, L. & Lopes, D., 2001. Avaliação da Situação Culicidéológica na Área do Complexo Turístico da Comporta/Atlantic Company (não publicado).
- Ribeiro, H. & Ramos, H. C., 1999. Identification keys of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Continental Portugal, Azores and Madeira. *European Mosquito Bulletin*, **3**:1–13.
- Richards, O.W. & Davies, R.G., 1984. *Imm's general book of entomology II: General classification and biology*. Chapman & Hall, New York. 1354 pp.

- Rojas, W., Northup, J., Gallo, O., Montoya, A.E., Montoya, F., Restrepo, M., Nimnich, G., Arango, M. & Echavarria, M., 1987. Reduction of malaria prevalence after introduction of *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae: Nematoda) in larval *Anopheles* habitats in Colombia. *Bulletin of the World Health Organization*, **65**(3):331–7.
- Sakulku, U., Nuchuchua, O., Uawongyart, N., Puttipipatkachorn, S., Soottitantawat, A. & Ruktanonchai, U., 2009. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, **372**(1-2):105–11.
- Service, M.W., 1980. *A guide to medical entomology*. Macmillan, London, 226 pp.
- Service, M.W., 1986. *Lecture notes on medical entomology*. Blackwell Scientific, Oxford, 272 pp.
- Service, M.W., 2008. *Medical entomology for students* (4th Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 306 pp.
- Smallegange, R.C., Qiu, Y.T., Bukovinszkiné-Kiss, G., Van Loon, J.J. & Takken, W., 2009. The effect of aliphatic carboxylic acids on olfaction-based host-seeking of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto*. *Journal of Chemical Ecology*, **35**(8):993–43.
- Sorci, G., Møller, A.P. & Boulinier, T., 1997. Genetics of host-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, **12**(5):196–200.
- Specos, M.M., García, J.J., Tornesello, J., Marino, P., Vecchia, M.D., Tesoriero, M.V. & Hermida, L.G., 2010. Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **104**(10):653–8.
- Sutherst, R.W., 2004. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, **17**:136–73.
- Tabachnick, W.J., 2009. Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistystems in a changing world. *The Journal of Experimental Biology*, **213**(6):946–54.
- Takken, W. & Knols, B.G., 1999. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, **44**:131–57.

- Tonnang, H.E., Kangelawe, R.Y.. & Yanda, P.Z., 2010. Predicting and mapping malaria under climate change scenarios: the potential redistribution of malaria vectors in Africa. *Malaria Journal*, **9**:111.
- Triplehorn, C. A. & Johnson, N. F., 2005. *Borror and DeLong's introduction to the study of insects*. (7th Ed.) Thomson-Brooks/Cole, Pacific Grove, California, 864 pp.
- Trongtokit, Y., Curtis, C.F. & Rongsriyam, Y., 2005. Efficacy of repellent products against caged and free flying *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **36**(6):1432–31.
- van den Berg, H., 2009. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environmental Health Perspectives*, **117**(11):1656–63.
- Vatandoost, H. & Hanafi-Bojd, A.A., 2008. Laboratory evaluation of 3 repellents against *Anopheles stephensi* in the Islamic Republic of Iran. *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale*, **148**(2):260–7.
- Vatandoost, H., Abai, M.R., Abbasi, M., Shaeghi, M., Abtahi, M. & Rafie, F., 2009. Designing of a laboratory model for evaluation of the residual effects of deltamethrin (K-othrine WP 5%) on different surfaces against malaria vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Borne Diseases*, **46**(4):261–7.
- Gillies, M.T., 1988. Anopheline mosquitos: vector behaviour and bionics, 453–86 pp. In W.H. Wernsdorfer & I. McGregor (eds.), *Malaria: Principles and practice of malariology. Volume 1*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- WHO, 2006. *Guidelines for testing mosquito aduulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets*. World Health Organization, Geneva, WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.3.
- WHO, 2007. *Report on the tenth WHOPES working group meeting*. World Health Organization, Geneva, WHO/CDS/NTD/WHOPES/2007.1.
- Zaim, M. & Guillet, P., 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends in Parasitology*, **18**(4):161-3

ANEXOS

ANEXO I

Nas tabelas seguintes estão representadas as diferenças entre a proporção de fêmeas que atingiram os compartimentos B no túnel-controlo e respectivo túnel-ensaio. As diferenças foram calculadas para todos os diferentes tempos de contagem (5, 10, 20, 40, 60 e 120 minutos). Os cálculos da média, desvio-padrão, diferença entre máximo e mínimo dizem respeito ao último tempo contabilizado (120 minutos).

Tecido Permetrina	Ensaio	Tempo (minutos)						Cálculos p/ 120 min
		5 min	10 min	20 min	40 min	60 min	120 min	
zero lavagens	1	22,28	29,41	32,41	29,10	30,09	27,93	$x = 27,03$
	2	13,31	18,93	23,67	25,72	21,75	16,62	$\sigma = 9,99$
	3	24,32	39,72	42,29	44,04	44,01	36,53	$M-m = 19,91$
5 lavagens	1	19,37	31,58	36,57	36,57	36,57	35,54	$x = 33,51$
	2	25,00	37,00	38,00	37,00	36,00	35,00	$\sigma = 3,05$
	3	20,00	30,00	35,00	32,00	32,00	30,00	$M-m = 5,54$
15 lavagens	1	23,11	32,05	37,06	38,03	38,01	39,02	$x = 28,86$ $\sigma = 5,67$ $M-m = 15,02$
	2	14,46	26,92	30,18	29,22	29,35	25,50	
	3	15,48	28,48	27,79	26,14	23,53	24,50	
	4	18,36	22,45	29,57	31,59	31,59	30,59	
	5	17,32	19,43	28,53	29,54	29,54	29,54	
	6	12,00	26,00	32,00	29,00	24,00	24,00	
25 lavagens	1	-5,11	-4,21	1,74	8,74	6,63	14,95	$x = 33,95$ $\sigma = 10,24$ $M-m = 27,90$
	2	10,32	22,49	38,66	39,67	39,67	41,71	
	3	10,81	26,75	34,72	34,72	34,72	33,71	
	4	12,80	19,72	22,65	25,65	25,65	25,65	
	5	13,06	19,08	32,95	40,87	41,86	42,85	
	6	22,57	31,43	39,34	39,34	39,34	39,34	
	7	25,44	32,38	35,38	37,38	37,38	39,44	
50 lavagens	1	24,24	34,34	39,39	40,40	40,40	30,30	$x = 30,71$ $\sigma = 7,65$ $M-m = 21,38$
	2	9,69	11,88	25,14	26,16	26,16	26,16	
	3	12,19	22,29	26,29	26,29	26,29	26,29	
	4	10,76	16,57	25,47	26,47	26,47	26,47	
	5	28,90	38,15	39,26	43,34	45,38	45,38	
	6	18,60	28,50	32,44	35,41	35,41	36,40	
	7	12,00	13,00	23,00	24,00	24,00	24,00	
60 lavagens	1	31,68	33,58	34,53	31,26	29,16	23,79	$x = 29,26$ $\sigma = 8,46$ $M-m = 24,81$
	2	13,32	22,55	31,76	33,82	33,82	16,66	
	3	24,82	35,13	46,47	47,82	49,00	41,46	
	4	13,00	18,00	25,00	30,00	30,00	31,00	
	5	11,11	16,16	25,25	29,29	29,29	29,29	
	6	8,65	19,52	26,45	29,41	31,39	33,37	

Legenda: Média (x); Desvio-padrão (σ); Máximo (M); Mínimo (m) e diferença entre Máximo e Mínimo ($M-m$).

Tecido DEET <i>formulação original</i>	Ensaio	Tempo (minutos)						Cálculos p/ 120 min
		5 min	10 min	20 min	40 min	60 min	120 min	
zero lavagens	1	24,23	30,13	24,83	21,68	21,68	19,57	$\bar{x} = 9,57$ $\sigma = 16,33$ $M-m = 33,22$
	2	14,57	27,42	25,32	23,30	27,22	27,22	
	3	2,00	0,00	0,00	-2,00	-2,00	-6,00	
	4	-4,29	2,64	3,56	-2,53	-2,53	-2,53	
5 lavagens	1	29,24	31,05	28,00	27,99	28,97	27,98	$\bar{x} = 16,82$ $\sigma = 8,09$ $M-m = 20,54$
	2	21,21	14,14	32,32	29,29	28,28	19,19	
	3	20,04	31,96	28,77	24,73	24,73	23,71	
	4	10,00	15,00	9,00	9,00	9,00	11,00	
	5	9,37	12,52	12,57	11,57	11,57	11,57	
	6	10,34	12,44	10,44	8,44	8,44	7,44	
10 lavagens	1	22,85	15,66	10,53	20,53	20,53	19,49	$\bar{x} = 15,51$ $\sigma = 9,33$ $M-m = 22,75$
	2	24,38	24,50	14,38	20,15	22,08	24,77	
	3	24,54	29,38	21,31	20,24	20,24	26,16	
	4	10,13	14,84	11,42	10,27	8,23	8,23	
	5	11,00	10,00	11,00	11,00	11,00	11,00	
	6	2,66	3,52	7,45	2,43	3,41	3,41	
15 lavagens	1	9,63	-3,81	6,87	6,87	6,87	4,87	$\bar{x} = 12,97$ $\sigma = 5,16$ $M-m = 13,13$
	2	3,36	6,49	10,58	10,58	10,58	14,67	
	3	8,53	13,73	21,96	12,96	12,96	17,06	
	4	6,79	6,66	8,54	8,54	8,54	8,54	
	5	7,07	8,86	14,70	14,70	14,70	14,70	
	6	8,00	9,00	14,00	16,00	16,00	18,00	
20 lavagens	1	15,25	16,32	20,54	20,54	20,54	20,54	$\bar{x} = 24,04$ $\sigma = 4,42$ $M-m = 8,46$
	2	22,00	18,00	20,00	22,00	20,00	29,00	
	3	12,67	8,02	15,44	22,58	22,58	22,58	

Legenda: Média (\bar{x}); Desvio-padrão (σ); Máximo (**M**); Mínimo (**m**) e diferença entre Máximo e Mínimo (**M-m**).

Tecido DEET n.º 2	Ensaio	Tempo (minutos)						Cálculos p/ 120 min
		5 min	10 min	20 min	40 min	60 min	120 min	
zero lavagens	1	24,86	29,80	35,71	36,69	39,69	39,69	$\bar{x} = 33,67$ $\sigma = 5,26$ $M-m = 9,69$
	2	21,21	28,28	32,32	31,31	31,31	31,31	
	3	18,00	18,00	23,00	28,00	29,00	30,00	
5 lavagens	1	18,23	23,29	31,32	30,33	30,33	30,34	$\bar{x} = 30,01$ $\sigma = 2,81$ $M-m = 7,38$
	2	16,61	26,50	27,49	28,47	28,47	28,47	
	3	14,67	23,98	29,18	29,18	27,18	27,18	
	4	17,31	30,49	35,56	36,57	34,57	34,57	
	5	14,71	18,63	23,51	28,51	29,49	29,49	

Legenda: Média (\bar{x}); Desvio-padrão (σ); Máximo (**M**); Mínimo (**m**) e diferença entre Máximo e Mínimo (**M-m**).

Tecido DEET n.º 3	Ensaio	Tempo (minutos)						Cálculos p/ 120 min
		5 min	10 min	20 min	40 min	60 min	120 min	
zero lavagens	1	31,62	29,49	21,47	21,47	19,47	20,46	
	2	8,00	-3,00	1,00	1,00	0,00	0,00	
	3	25,76	23,92	17,06	17,06	17,06	16,06	x = 15,55
	4	19,33	17,57	19,63	18,64	18,64	18,64	σ = 13,41
	5	34,34	38,38	37,37	37,37	37,37	36,36	M-m = 36,36
	6	13,55	12,71	1,76	1,76	1,76	1,76	

Legenda: Média (**x**); Desvio-padrão (**σ**); Máximo (**M**); Mínimo (**m**) e diferença entre Máximo e Mínimo (**M-m**).

Tecido Citronela	Ensaio	Tempo (minutos)						Cálculos p/ 120 min
		5 min	10 min	20 min	40 min	60 min	120 min	
zero lavagens	1	6,00	0,00	11,00	7,00	7,00	10,00	
	2	1,54	0,38	-0,64	-1,65	-1,65	1,35	
	3	7,00	4,00	3,00	3,00	3,00	3,00	x = 14,37
	4	23,53	34,49	29,31	29,31	29,31	29,31	σ = 13,29
	5	0,31	3,46	7,56	4,58	1,58	1,58	M-m = 27,95
	6	24,67	42,52	31,40	30,39	27,36	27,36	
	7	24,00	17,00	34,00	29,00	28,00	28,00	
5 lavagens	1	-3,26	0,42	3,64	3,64	3,64	2,64	x = 4,27
	2	10,00	7,00	3,00	3,00	3,00	3,00	σ = 2,51
	3	4,47	7,90	9,16	7,16	7,16	7,16	M-m = 4,52

Legenda: Média (**x**); Desvio-padrão (**σ**); Máximo (**M**); Mínimo (**m**) e diferença entre Máximo e Mínimo (**M-m**).

Tecido <i>Petit Patapon</i> ®	Ensaio	Tempo (minutos)						Cálculos p/ 120 min
		5 min	10 min	20 min	40 min	60 min	120 min	
s/ lavagens	1	22,00	29,00	36,00	40,00	40,00	32,00	x = 30,00
	2	24,44	22,52	29,59	31,61	30,61	29,62	σ = 1,83
	3	22,55	24,48	27,45	26,43	28,41	28,40	M-m = 3,60

Legenda: Média (**x**); Desvio-padrão (**σ**); Máximo (**M**); Mínimo (**m**) e diferença entre Máximo e Mínimo (**M-m**).

Tecido impregnado de permetrina sem e com 25 lavagens para a espécie *Cx. theileri*:

Tecido Permetrina	Ensaio	Tempo (minutos)						Cálculos p/ 120 min
		5 min	10 min	20 min	40 min	60 min	120 min	
zero lavagens	1	16,67	18,75	21,88	21,88	21,88	20,83	x = 24,09
	2	22,33	23,26	23,26	27,34	27,34	27,34	σ = 4,60
								M-m = 6,51
25 lavagens	1	10,87	19,78	9,65	10,61	10,61	12,61	x = 14,80
	2	12,00	18,00	17,00	17,00	17,00	17,00	σ = 3,11
								M-m = 4,39

Legenda: Média (**x**); Desvio-padrão (**σ**); Máximo (**M**); Mínimo (**m**) e diferença entre Máximo e Mínimo (**M-m**).

ANEXO II

Dados necessários para a elaboração dos gráficos da **Figura IV.5.**:

Tecido impregnado com permetrina sujeito a diferentes ciclos de lavagem.

Lavagem	Tecido Tempo (minutos)	Permetrina			
		Média		Desvio-Padrão	
		Controlo	Ensaio	Controlo	Ensaio
Zero lavagens	5	28,41	8,44	6,83	1,22
	10	39,94	10,58	10,77	1,13
	20	46,76	13,97	11,24	1,92
	40	50,45	17,50	11,41	2,66
	60	52,93	20,98	9,72	1,70
	120	53,23	26,20	9,35	3,26
5 Lavagens	5	27,14	5,69	5,79	3,18
	10	42,91	10,05	6,13	4,27
	20	54,35	17,83	1,50	1,26
	40	54,35	19,16	1,50	2,76
	60	54,35	19,50	1,50	2,79
	120	54,35	20,84	1,50	3,24
25 Lavagens	5	35,80	22,95	5,55	8,53
	10	49,49	28,40	5,52	7,41
	20	59,48	30,14	6,69	7,93
	40	62,47	30,14	5,18	7,93
	60	62,62	30,44	5,37	8,61
	120	63,62	29,67	5,76	7,05
50 Lavagens	5	34,35	17,72	5,83	5,95
	10	46,70	23,16	4,93	7,77
	20	54,75	24,60	1,75	7,10
	40	56,47	24,75	2,48	7,26
	60	56,76	24,75	2,93	7,26
	120	57,19	26,48	2,93	5,56

Tecido com DEET micro-encapsulado (formulação original) sem e com 5 lavagens.

Lavagem	Tecido Tempo (minutos)	DEET			
		Média		Desvio-Padrão	
		Controlo	Ensaio	Controlo	Ensaio
Zero lavagens	5	30,84	21,71	5,16	12,49
	10	45,87	30,83	7,32	19,46
	20	49,37	35,94	4,46	17,16
	40	49,87	39,76	4,37	18,06
	60	51,35	40,26	3,84	17,47
	120	51,35	41,79	3,84	18,30
5 Lavagens	5	40,27	23,57	5,14	5,67
	10	56,14	36,62	9,28	5,23
	20	64,68	44,50	12,92	7,54
	40	64,34	45,84	12,25	6,48
	60	64,51	46,01	12,39	6,42
	120	64,84	48,02	12,36	6,76

Tecido com citronela micro-encapsulada sem e com 5 lavagens.

Lavagem	Tecido Tempo (minutos)	Citronela			
		Média		Desvio-Padrão	
		Controlo	Ensaio	Controlo	Ensaio
Zero lavagens	5	45,33	32,90	8,11	7,99
	10	58,78	44,23	15,83	10,66
	20	68,22	51,70	12,13	10,61
	40	68,51	53,99	11,80	10,16
	60	68,51	55,00	11,80	10,46
	120	69,37	55,00	11,33	10,46
5 Lavagens	5	30,07	26,33	10,35	6,66
	10	48,11	43,00	3,60	5,29
	20	56,27	51,00	1,78	2,00
	40	56,27	51,67	1,78	1,15
	60	56,27	51,67	1,78	1,15
	120	56,27	52,00	1,78	1,00